



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der
europäischen Patentschrift

⑧ EP 0 604 552 B1

⑩ DE 692 17 497 T 2

⑤ Int. Cl.⁸:
C 07 H 21/00

C 07 K 1/04
C 07 K 1/08
C 07 K 5/10
C 07 K 7/06
C 12 N 15/10
C 12 N 15/11

DE 692 17 497 T 2

②	Deutsches Aktenzeichen:	692 17 497.4
⑧	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US82/07815
⑧	Europäisches Aktenzeichen:	92 920 422.0
⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 83/08121
⑥	PCT-Anmeldetag:	18. 9. 82
⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	1. 4. 83
⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	6. 7. 84
⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	12. 2. 97
⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	12. 6. 97

③ Unionspriorität: ② ③ ③

18.09.91 US 762522

⑦ Patentinhaber:

Affymax Technologies N.V., Willemstad, Curacao,
AN

⑦ Vertreter:

Dr. Volker Vossius, Patentanwalt, Corinna Vossius,
Rechtsanwältin, Tilman Vossius, Rechtsanwalt,
81679 München

⑧ Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, SE

⑦ Erfinder:

DOWER, William, J., Menlo Park, CA 94025, US;
BARRETT, Ronald, W., Sunnyvale, CA 94087, US;
GALLOP, Mark, A., East Palo Alto, CA 94303, US;
NEEDEL, Michael, C., Oakland, CA 94602, US

⑥ VERFAHREN ZUR SYNTHESE DER VERSCHIEDENEN SAMMLUNGEN VON OLIGOMEREN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 692 17 497 T 2

Best Available Copy

5

10
**VERFAHREN ZUR SYNTHESE DER VERSCHIEDENEN SAMMLUNGEN VON
OLIGOMEREN**

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein stochastische Verfahren zur Synthese von statistischen Oligomeren (random oligomers) mit besonderer Betonung auf synthetische Methoden auf der Basis von Teilchen. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Identifizierungs-Tags an den Teilchen, um die Identifizierung der synthetisierten Oligomersequenz zu vereinfachen.

Die Beziehung zwischen der Struktur und der Aktivität der Moleküle ist ein grundlegendes Problem bei der Untersuchung von biologischen Systemen. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sind wichtig beim Verständnis z.B. der Funktion der Enzyme, der Arten, in denen Zellen miteinander kommunizieren und von zellulären Kontroll- und Rückkopplungssystemen. Es ist bekannt, daß bestimmte Makromoleküle miteinander wechselwirken und an andere Moleküle binden, die eine sehr spezifische dreidimensionale räumliche und elektronische Verteilung haben. Jedes große Molekül mit einer solchen Spezifität kann als ein Rezeptor angesehen werden, unabhängig davon, ob das Molekül ein Enzym ist, das die Hydrolyse eines metabolischen Zwischenprodukts katalysiert, ein Zell-Oberflächenprotein, das den Membrantransport von Ionen vermittelt, ein Glykoprotein, das dazu dient, eine bestimmte Zelle seinen Nachbarn gegenüber zu identifizieren, ein Antikörper der IgG-Klasse, der im Plasma zirkuliert, eine Oligonucleotidsequenz von DNA in dem Genom oder ähnliches ist. Die verschiedenen Moleküle, die Rezeptoren selektiv binden, sind als Liganden bekannt.

Es sind viele Nachweise zum Messen der Bindungsaffinität von bekannten Rezeptoren und Liganden verfügbar. Die Information, die aus solchen Experimenten gewonnen werden kann, ist jedoch oft durch die Anzahl und Art der verfügbaren Liganden beschränkt. Neue Liganden werden manchmal zufällig oder durch Anwenden neuer Techniken zur Aufklärung der Molekülstruktur entdeckt, einschließlich röntgenkristallographischen Analysen und rekombinanten genetischen Techniken für Proteine.

Kleine Peptide sind ein exemplarisches System zum Erforschen der Beziehung zwischen Struktur und Funktion in der Biologie. Ein Peptid ist ein Polymer, das aus Aminosäuremonomeren zusammengesetzt ist. Wenn die zwanzig natürlich vorkommenden Aminosäuren zu polymeren Molekülen kondensiert werden, bilden die sich ergebenden Polymere eine weite Vielzahl von dreidimensionalen Konfigurationen, die sich jeweils aus einer bestimmten Aminosäuresequenz und Lösungsmittelbedingungen ergeben. Die Anzahl möglicher Pentapeptide der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ist z.B. 20^5 oder 3,2 Millionen verschiedene Peptide. Die Wahrscheinlichkeit, daß Moleküle dieser Größe in Rezeptor-Bindungsuntersuchungen verwendbar sind, wird durch Epitopenalyseuntersuchungen unterstützt, die zeigen, daß einige Antikörper Sequenzen mit einer hohen Spezifität erkennen, die nur einige Aminosäuren lang sind. Außerdem liegen kleine Peptide wegen des Durchschnittsmolekulargewichts von Aminosäuren im Größenbereich vieler derzeit verwendeter pharmazeutischer Produkte. Selbstverständlich können größere Peptide für viele Zwecke notwendig sein, und Polypeptide mit Änderungen in nur einer kleinen Anzahl von Resten können auch für solche Zwecke, wie die Analyse von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, verwendbar sein.

Die Entdeckung pharmazeutischer Arzneimittel ist eine Art von Forschung, die auf der Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen beruht. In den meisten Fällen kann die derzeitige pharmazeutische Forschung als das Verfahren zum Auffinden neuer Liganden mit erwünschten Mustern der Spezifität für biologisch wichtige Rezeptoren beschrieben werden. Ein weiteres Beispiel ist die Forschung, um neue Verbindung zur Verwendung in der Landwirtschaft zu entdecken, wie Pestizide und Herbizide.

Frühere Verfahren zur Herstellung einer großen Anzahl verschiedener Oligomere waren schmerzlich langsam, wenn sie in einem Maßstab verwendet wurden, der für effektive, rationale oder zufällige Durchmusterung ausreichend ist. Beispielsweise wurde das "Merrifield"-Verfahren, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963) verwendet, um Peptide an einem festen Träger zu synthetisieren. Im Merrifield-Verfahren ist eine Aminosäure kovalent an den Träger gebunden, der aus einem unlöslichen Polymer gemacht ist. Eine weitere Aminosäure mit einer alpha-geschützten Gruppe wird mit der kovalent gebundenen Aminosäure umgesetzt, um ein Dipeptid zu bilden. Die Schutzgruppe wird entfernt, und eine dritte Aminosäure mit einer alpha-geschützten Gruppe wird dem Dipeptid zugefügt. Dieses Verfahren wird fortgesetzt, bis ein Peptid der gewünschten Länge und Sequenz erhalten wird. Unter Verwendung des Merrifield-Verfahrens kann man nicht mehr als einige Peptidsequenzen an einem Tag wirtschaftlich und praktikabel synthetisieren.

Um eine große Anzahl von Oligomersequenzen zu synthetisieren, wurde von Anderen vorgeschlagen, eine Reihe von Reaktionsgefäßen für die Oligomersynthese zu verwenden. Beispielsweise kann ein tubuläres Reaktorsystem verwendet werden, um ein lineares Oligomer an einem Festphasenträger durch automatische sequenzielle Zugabe der Reagenzien zu synthetisieren. Dieses Verfahren ermöglicht immer noch nicht die Synthese einer ausreichend großen Anzahl von Oligomersequenzen zur effektiven wirtschaftlichen Durchmusterung.

Verfahren zur Herstellung einer Vielzahl von Oligomersequenzen sind ebenfalls bekannt, in denen ein poröser Behälter (foraminous container) eine bekannte Menge an reaktiven festen Trägern beinhaltet, wobei die festen Träger größer in der Größe sind, als die Öffnungen des Behälters; siehe US-PS 4,631,211. Die Behälter können selektiv mit den gewünschten Materialien umgesetzt werden, um die erwünschten Sequenzen der Produktmoleküle zu synthetisieren. Wie mit anderen bekannten Verfahren kann dieses Verfahren nicht praktikabel eingesetzt werden, um eine genügende Vielfalt an Polypeptiden für effektives Durchmustern zu synthetisieren.

Andere Techniken sind auch beschrieben worden. Ein Verfahren auf der Basis von Perlen ist in der PCT-Patentveröffentlichung Nr. 92/00091 beschrieben. Diese Verfahren beinhalten die Synthese von Peptiden an 96-Plastik-Pins, die dem Format von Standard-Mikrotiterplatten angepaßt sind; siehe PCT-Patentveröffentlichungen 84/03564; 86/00991 und 86/06487. Obwohl diese Verfahren einigermaßen verwendbar waren, blieben leider wesentliche Probleme. Zum Beispiel sind diese Verfahren weiterhin in der Vielfalt an Sequenzen, die wirtschaftlich synthetisiert und durchmustert werden können, begrenzt.

Andere haben rekombinante Verfahren zur Herstellung von Sammlungen von Oligomeren entwickelt; siehe PCT-Patentveröffentlichungen Nr. 91/17271 und 91/19818. In einer anderen wichtigen Entwicklung haben Wissenschaftler die Verfahren für Photolithographie, Chemie und Biologie vereint, um große Sammlungen von Oligomeren und anderen Verbindungen auf der Oberfläche eines Substrats herzustellen; siehe US-PS 5,143,854 und PCT-Patentveröffentlichungen Nr. 90/15070 und 92/10092.

In den rekombinanten und VLSIPSTM kombinatorischen Verfahren kann man einzigartig jedes Oligomer in der Bibliothek durch Bestimmen der codierenden Sequenzen in dem rekombinanten Organismus oder Phagen oder durch Lokalisierung des Oligomers an dem VLSIPSTM-Chip identifizieren. In anderen Verfahren kann jedoch die Identität eines bestimmten Oligomers schwierig zu bestimmen sein. Für diese späteren Verfahren ist es notwendig, ein effizientes und einfach zu gebrauchendes Verfahren zum Taggen der

jeweiligen Teilchen zu haben. Obwohl Tagging-Verfahren für große Objekte entwickelt wurden, siehe PCT-Patentveröffentlichungen Nr. 90/14441 und 87/06383, gibt es immer noch einen Bedarf an solchen Verfahren für kombinatorische Bibliotheken für Oligomere.

5 Aus dem Vorstehenden sieht man, daß verbesserte Verfahren zur Synthese einer verschiedenartigen Sammlung chemischer Sequenzen nützlich wären.

Die Erfindung stellt die Verwendung von Identifizierungs-Tags zur Verfügung, um eine nachfolgende Identifizierung von Reaktionen zu ermöglichen, durch die die Mitglieder einer
10 Bibliothek von verschiedenen synthetischen Verbindungen in einer Baustein-bei-Baustein-Art synthetisiert worden sind, und darauffolgende deduktive strukturelle Identifizierung der Mitglieder. In einem weiteren Aspekt liefert die Erfindung eine Bibliothek verschiedener synthetischer Verbindungen, wobei die Verbindungen durch die Synthese in einer Baustein-bei-Baustein-Art erhältlich sind, die jede Verbindung mit einem oder mehreren
15 Identifizierungs-Tags verbindet, was die nachfolgende Identifizierung der Reaktionen ermöglicht, durch die die Komponenten eingefügt wurden und anschließende deduktive strukturelle Identifizierung der Mitglieder.

Die vorliegende Erfindung liefert ein allgemeines stochastisches Verfahren zur Synthese von
20 Bibliotheken von statistischen Oligomeren. Die statistischen Oligomere werden an festen Trägern oder Teilchen synthetisiert, aber sie können von diesen Trägern abgespalten werden, um eine lösliche Bibliothek zu liefern. Die Oligomere sind aus einer Sequenz von Monomeren zusammengesetzt, wobei die Monomere jedes Mitglied eines Satzes an Molekülen sind, die verbunden sein können, um ein Oligomer oder Polymer zu bilden, d.h.
25 Aminosäuren, Carbamate, Sulfone, Sulfoxide, Nucleoside, Kohlenhydrate, Harnstoffe, Phosphonate, Lipide, Ester, Kombinationen davon und ähnliches. Die Bibliothek wird sodann durchmustert, um individuelle Oligomere zu isolieren, die an einen Rezeptor binden oder einige erwünschte Eigenschaften haben. Jede Oligomersequenz in der Bibliothek ist einzigartig in einer bevorzugten Ausführungsform. In einer anderen bevorzugten Aus-
30 führungsform sind die festen Träger nicht poröse Perlen. Die festen Träger können aus einem einzigen Teilchen zusammengesetzt sein oder aus zwei oder mehr verknüpften Teilchen.

Die Erfindung beinhaltet die Verwendung eines Identifizierungs-Tags, um die Sequenz von
35 Monomeren in dem Oligomer zu identifizieren. Das Identifizierungs-Tag, das direkt an das Oligomer mit oder ohne ein begleitendes Teilchen gebunden sein kann, oder an einen Linker, der an das Oligomer, an den festen Träger, an dem das Oligomer synthetisiert wird, oder an ein zweites, das Oligomer-tragende Teilchen gebundene Teilchen gebunden sein

kann, kann jedes erkennbare Merkmal sein, das auf irgendeine Weise die notwendige Information trägt, und das bei dem Niveau eines oder weniger fester Träger entschlüsselbar ist. Die festen Träger können an die Oligomere und den Identifizierungs-Tag mittels einem oder mehrerer Linker-Moleküle gebunden sein.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Identifizierungs-Tag ein Oligonucleotid, vorzugsweise zusammengesetzt aus Pyrimidinen oder Pyrimidinen und Purinanaloga oder jeder Art von Nucleosid, das unter den Kupplungsbedingungen nicht abgebaut wird, die verwendet werden, um die Oligomer-Bibliothek zusammenzusetzen. Das Oligonucleotid-
10 Identifizierungs-Tag kann eine 5'- und eine 3'-Vervielfältigungsstelle enthalten, um die Vervielfältigung des Tags durch beispielsweise Polymerase-Kettenreaktion zu ermöglichen (siehe US-PSen 4,683,202 und 4,965,188). Eine DNA-Sequenzierungs-Primer-Stelle, die spezifisch für jeden Schritt der Oligomersynthese sein kann, kann auch in dem Oligo-
15 nucleotid-Tag, zusätzlich zu den Vervielfältigungs-Primer-Stellen, enthalten sein. Das Tag kann so ausgebildet sein, daß es in der Oligonucleotidsequenz Information beinhaltet, die die Identifizierung des assoziierten Monomers mit der Zugabe eines bestimmten Tags erlaubt. Das Oligonucleotid-Tag hat in einer bevorzugten Ausführungsform eine Länge von etwa 50 bis 100 Nucleotiden.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform kann das Identifizierungs-Tag aus einem Satz an Verbindungen, die mit Licht ansprechbar sind, zusammengesetzt sein, wie Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzverbindungen, die photo-gebleicht werden können, wobei die Verbindungen in die Perlen oder Teilchen einverleibt werden, an welchen die Oligomere der Oligomer-Bibliothek synthetisiert werden. Solche Verbindungen sind bekannt.

25 Fig. 1 ist eine schematische Darstellung einer kombinatorischen Oligomersynthese an Teilchen.

Fig. 2 ist eine schematische Darstellung von gleichzeitiger kombinatorischer Oligomer-
30 synthese und Teilchen-tagging.

Fig. 3 beschreibt ein Verfahren zur Funktionalisierung der Perlen, die kompatible Chemie für die Peptidsynthese und die Runde-bei-Runde-Anheftung der Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags, einschließlich der Synthese der Amino-funktionalisierten Perlen, die Struktur der geschützten 5'-Maleimidyl-Oligonucleotide, Aminosäure-Kupplung und Einführung
35 eines Thiol-„Henkels“, Schritt-spezifische Oligonucleotid-Anheftung an eine Perle, anschließende Aminosäure-Kupplung(en) und Oligonucleotid-Anheftung(en) und Entfernen der Peptid- und Oligonucleotid-Schutzgruppen.

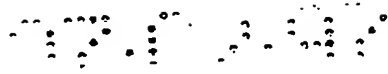


Fig. 4 ist eine schematische Darstellung eines Beispiels eines Oligonucleotid-Tags.

Fig. 5 zeigt Nucleosid-Phosphoramidite, die mit photolabilen Schutzgruppen für die parallele Peptid-/Oligonucleotidsynthese derivatisiert sind.

Fig. 6 zeigt 5'-DMT-3'-(O-Allyl-N,N'-diisopropyl-phosphoramidit)-Nucleosidderivate für parallele Peptid-/Oligonucleotidsynthese.

Fig. 7 zeigt die Herstellung eines bifunktionalen Perlenmaterials zur parallelen Synthese von Peptiden und Oligonucleotiden.

Fig. 8 zeigt die parallele Zusammensetzung von Oligonucleotid-getaggten Peptiden an Perlen.

Fig. 9 zeigt eine schematische Darstellung eines Experiments, das in Beispiel 5 beschrieben ist, in dem zwei Populationen von Oligomeren an Perlen hergestellt, getaggt, vermisch, sortiert und mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden.

Fig. 10 zeigt die Auflösung zweier Populationen von Perlen mit FACS in dem in Beispiel 5 beschriebenen Experiment. Die Werte entlang der horizontalen Achse bedeuten die relative Fluoreszenz (Log-Einheit). Die Werte entlang der vertikalen Achse bedeuten die relative Anzahl an Perlen. Nicht-Fluoreszenz-markierte Perlen werden durch den Peak A dargestellt. Fluoreszenz-markierte Perlen sind durch den Peak B dargestellt. Das Verhältnis des größeren Peaks zu dem kleineren Peak ist 15:1.

Fig. 11 zeigt Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten, UV-bestrahlten Agarosegelen von PCR-Produkten, die durch die Vervielfältigung nach FACS von zwei Perlenpopulationen und Vervielfältigen der Tags an den ausgewählten Perlen mit Kontrollen, wie in Beispiel 5 beschrieben, erhalten werden. Gel A zeigt die Ergebnisse mit ausgewählten Fluoreszenz-perlen: Spur 1 - $2,4 \times 10^6$ Kopien (100 Perlenäquivalente) eines 95-mer-Tags; Spuren 2-7 - PCR-Produkt aus einzelnen Fluoreszenzperlen; Spuren 8-10 - PCR-Produkt aus 10 Fluoreszenzperlen; Spuren 11-13 - PCR-Produkt aus 100 Fluoreszenzperlen; und Spur 14 - $1,2 \times 10^6$ Kopien (100 Perlenäquivalente) eines 110-mer-Tags. Gel B zeigt das Ergebnis mit sortierten Nicht-Fluoreszenzperlen: Spur 1 - $1,2 \times 10^6$ Kopien eines 110-mer-Tags; Spuren 2-7 - PCR-Produkt aus Einzel-Nicht-Fluoreszenzperlen; Spuren 8-10 - PCR-Produkt aus 10 Nicht-Fluoreszenzperlen; Spuren 11-13 - PCR-Produkt aus 100 Nicht-Fluoreszenzperlen; und Spur 14 - $2,4 \times 10^6$ Kopien eines 95-mer-Tags. Gel C zeigt das Ergebnis mit den

Kontrollreaktionen: Spuren 1, 12 - DNA-Größenstandards; Spuren 2, 3 - keine Tag-Kontrollreaktionen; Spuren 4, 5 - 1 Perlenäquivalent des löslichen 95-mer-Tags; Spuren 6, 7 - 10 Perlenäquivalente des löslichen 95-mer-Tags; Spuren 8, 9 - 1 Perlenäquivalent des löslichen 110-mer-Tags und Spuren 10, 11 - 10 Perlenäquivalente des löslichen 110-mer-Tags.

5

Die vorliegende Erfindung liefert neue Verfahren zur Herstellung großer synthetischer Oligomer-Bibliotheken. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist jedes Mitglied einer solchen Bibliothek einzigartig markiert in einer Art, die die Identität der Sequenz des Oligomers, das dem Mitglied entspricht, spezifiziert. Verfahren zur Durchmusterung solcher Bibliotheken und verwendbare Reagenzien zur Herstellung der Bibliotheken werden ebenfalls zur Verfügung gestellt.

10

Glossar

15

Die nachstehenden Ausdrücke sollen die folgenden allgemeinen Bedeutungen haben, wie sie hier verwendet werden:

Komplementär oder im wesentlichen komplementär:

20

Diese Ausdrücke beziehen sich auf Basenpaarungen zwischen Nucleotiden oder Nucleinsäuren, wie beispielsweise zwischen den zwei Strängen eines doppelsträngigen DNA-Moleküls oder zwischen einem Oligonucleotid-Primer und einer Primer-Bindungsstelle an einer einzelsträngigen Nucleinsäure, die sequenziert oder vervielfältigt werden soll. „Komplementäre“ Nucleotide sind im allgemeinen A und T (oder A und U) und C und G, wie bekannt ist. Zwei einzelsträngige RNA- oder DNA-Moleküle werden als „im wesentlichen komplementär“ bezeichnet, wenn die Nucleotide des einen Strangs optimal angelagert, mit mindestens etwa 80% der Nucleotide des anderen Strangs gepaart sind.

25

Alternativ besteht im wesentlichen Komplementarität, wenn ein RNA- oder DNA-Strang unter selektiven Hybridisierungsbedingungen an eine komplementäre Nucleinsäure hybridisiert. In der Regel tritt selektive Hybridisierung auf, wenn mindestens etwa 55% Komplementarität über einen Bereich von mindestens 14 bis 25 Nucleotiden auftritt, jedoch tritt eine selektivere Hybridisierung auf, wenn die Komplementarität auf 65%, 75%, 90% und 100% ansteigt. Siehe Kanehisa, Nucleic Acids Res. 12: 203 (1984).

30

35

Strenge Hybridisierungsbedingungen beinhalten in der Regel Salzkonzentrationen von weniger als 1 M, wie weniger als 500 mM, und werden oft Salzkonzentrationen von weniger als 200 mM beinhalten. Die Hybridisierungstemperatur für Oligomere ist in der Regel

höher als 22°C, wie höher als 30°C und wird häufig höher als etwa 37°C sein. Längere Fragmente können höhere Hybridisierungstemperaturen für spezielle Hybridisierungen erfordern. Da andere Faktoren die Stringenz der Hybridisierung dramatisch beeinflussen können (solche Faktoren beinhalten Basenzusammensetzung, Länge der komplementären Stränge, Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln und Ausmaß der Basen-Nichtübereinstimmung), ist die Kombination der Faktoren wichtiger, als das absolute Maß jedes einzelnen Faktors.

Epitop:

Der Teil eines Antigenmoleküls, der durch den Bereich der Wechselwirkung mit der Unterklasse an Rezeptoren, bekannt als Antikörper, beschrieben ist, ist ein „Epitop“.

Identifizierungs-Tag:

Ein „Identifizierungs-Tag“ ist ein physikalisches Attribut, das ein Mittel liefert, wodurch man feststellen kann, welche Monomerreaktionen an einem individuellen festen Träger bei der Synthese eines Oligomers durchgeführt wurden. Das Identifizierungs-Tag zeichnet auch den Schritt in den Synthesereihen auf, in dem der feste Träger an dieser Monomerreaktion teilgenommen hat. Das Identifizierungs-Tag kann jedes erkennbare Merkmal sein, einschließlich beispielsweise: eine mikroskopisch unterscheidbare Form, Größe, Farbe, optische Dichte, etc.; eine unterschiedliche Absorbierung oder Emission von Licht; chemische Reaktivität; magnetisch oder elektronisch codierte Information oder jedes andere unterscheidende Kennzeichen mit der erforderlichen Information und das auf dem Niveau eines (oder weniger) fester Träger entschlüsselbar ist. Ein bevorzugtes Beispiel eines solchen Identifizierungs-Tags ist eine Oligonucleotidsequenz. Ein „Identifizierungs-Tag“ kann direkt an das synthetisierte Oligomer gekuppelt sein, unabhängig davon, ob ein fester Träger bei der Synthese verwendet wurde. In dieser letzteren Ausführungsform dient das Identifizierungs-Tag als der „Träger“ für die Oligomersynthese.

Ligand:

Ein „Ligand“ ist ein Molekül, das von einem bestimmten Rezeptor erkannt wird. Das Mittel, das von dem Rezeptor gebunden wird oder damit reagiert, wird ein „Ligand“ genannt, ein Ausdruck, der per definitionem nur im Sinne seines Gegenstück-Rezeptors Bedeutung hat. Der Ausdruck „Ligand“ bedeutet keine besondere Molekülgröße oder andere strukturelle Merkmale oder Zusammensetzungsmerkmale, außer daß die fragliche Substanz in der Lage ist, an den Rezeptor zu binden oder in einer anderen Weise mit dem Rezeptor

wechselzuwirken. Ein „Ligand“ kann auch entweder als der natürliche Ligand, an den der Rezeptor bindet oder als ein funktionales Analogon, das als ein Agonist oder Antagonist wirken kann, dienen. Liganden, die mit dieser Erfindung untersucht werden können, beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf, Agonisten und Antagonisten für Zellmembranrezeptoren, Toxine und Venome, virale Epitope, Hormone, Zucker, Kofaktoren, Peptide, Enzymsubstrate, Arzneimittel (z.B. Opiate, Steroide, etc.) und Proteine.

Monomer:

Ein „Monomer“ ist ein Mitglied eines Satzes von Molekülen, die verbunden werden können unter Bildung eines Oligomers oder Polymers. Der Satz an erfindungsgemäß verwendbaren Monomeren beinhaltet, ist jedoch nicht beschränkt auf, z.B. in der Peptidsynthese, den Satz an L-Aminosäuren, D-Aminosäuren oder synthetischen Aminosäuren. Wie hier verwendet, bezieht sich „Monomer“ auf jedes Mitglied eines Basissatzes zur Synthese eines Oligomers. Z.B. Dimere von L-Aminosäuren bilden einen Basissatz von 400 „Monomeren“ für die Synthese von Polypeptiden. Verschiedene Basissätze an Monomeren können in aufeinanderfolgenden Schritten in der Synthese eines Polymers verwendet werden.

Oligomer oder Polymer:

Die „Oligomer“- oder „Polymer“-Sequenzen der vorliegenden Erfindung werden aus der chemischen oder enzymatischen Addition von Monomer-Untereinheiten gebildet. Solche Oligomere beinhalten beispielsweise sowohl lineare, cyclische und verzweigte Polymere von Nucleinsäuren, Polysacchariden, Phospholipiden und Peptiden mit entweder alpha-, beta- oder omega-Aminosäuren, Heteropolymere, Polyurethane, Polyester, Polycarbonate, Polyharnstoffe, Polyamide, Polyethylenimine, Polyarylsulfide, Polysiloxane, Polyimide, Polyacetate oder andere Polymere, wie dem Fachmann beim Lesen dieser Beschreibung offensichtlich ist.

Peptid:

Ein „Peptid“ ist ein Oligomer, in dem die Monomere alpha-Aminosäuren sind, die über Amidbindungen verknüpft sind. Alternativ kann ein „Peptid“ als „Polypeptid“ bezeichnet werden. Im Zusammenhang mit dieser Beschreibung erkennt man, daß die Aminosäuren das L-optische Isomer oder D-optische Isomer sein können. Peptide sind mehr als zwei Aminosäuremonomere lang, und sind häufiger mehr als 10 Aminosäuremonomere lang und können sogar länger als 20 Aminosäuren sein, obwohl Peptide, die länger als 20 Ami-

nosäuren sind, eher als „Polypeptide“ bezeichnet werden. Es werden Standard-Einzelbuchstabenabkürzungen für Aminosäuren verwendet (z.B. P für Prolin).

Oligonucleotide:

5

Ein „Oligonucleotid“ ist ein einzelsträngiges DNA- oder RNA-Molekül, das in der Regel mit synthetischen Mitteln hergestellt wurde. Die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Oligonucleotide haben gewöhnlich eine Länge von 50 bis 150 Nucleotiden, vorzugsweise von 80 bis 120 Nucleotiden, obwohl Oligonucleotide mit unterschiedlicher Länge in einigen

10 Fällen angemessen sein können. In einer Ausführungsform der Erfindung werden beispielsweise das Oligonucleotid-Tag und das mit diesem Tag identifizierte Polymer parallel synthetisiert. In dieser Ausführungsform kann das Oligonucleotid-Tag durch Nucleotid-bei-Nucleotid-Zugabeschritte aufgebaut werden - in Koordination mit den Monomer-bei-Monomer-Zugabeschritten, die verwendet werden, um das Oligomer zu

15 synthetisieren. Zusätzlich können sehr kurze Oligonucleotide, d.h. 2 bis 10 Nucleotide, verwendet werden, um ein bestehendes Oligonucleotid-Tag zu erweitern, um einen Monomer-Kupplungsschritt zu identifizieren. Geeignete Oligonucleotide können mit Phosphoramidit-Verfahren hergestellt werden, wie von Beaucage und Carruthers, Tetr. Lett. 22: 1859-1862 (1981), oder mit dem Triester-Verfahren nach Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981), oder mit anderen Verfahren, wie unter Verwendung her-

20 kömmlicher automatisierter Oligonucleotid-Synthesizer hergestellt werden.

Operativ verknüpft:

25

Eine Nucleinsäure ist „operativ verknüpft“, wenn sie in eine funktionale Beziehung mit einer weiteren Nucleinsäuresequenz gebracht wird. Beispielsweise ist ein Promotor oder ein Enhancer „operativ verknüpft“ mit einer codierenden Sequenz, wenn der Promotor die Transkription der Sequenz verursacht. Gewöhnlich bedeutet operativ verknüpft, daß die DNA-Sequenzen aneinandergrenzend verknüpft sind und, falls es notwendig ist, zwei

30 Protein-codierende Regionen zu verknüpfen, aneinandergrenzend und in einem Leserahmen.

Rezeptor:

35

Ein „Rezeptor“ ist ein Molekül, das eine Affinität zu einem gegebenen Liganden hat. Rezeptoren können natürlich vorkommende oder künstlich hergestellte Moleküle sein. Rezeptoren können in ihrer unveränderten natürlichen oder isolierten Form oder als Aggregate mit anderen Spezies verwendet werden. Rezeptoren können kovalent oder nicht-kovalent an ein bindendes Mitglied gebunden sein, entweder direkt oder über eine spezielle

Bindungssubstanz. Beispiele für Rezeptoren, die in den erfindungsgemäßen Verfahren angewendet werden können, beinhalten, sind jedoch nicht beschränkt auf, Antikörper, Zellmembranrezeptoren, monoklonale Antikörper, Antiseren, die mit spezifischen antigenen Determinanten reagieren (wie auf Viren, Zellen oder anderen Materialien), Polynucleotide, Nucleinsäuren, Lectine, Polysaccharide, Zellen, zellulären Membranen und Organelle. Rezeptoren werden manchmal als „Antiliganden“ bezeichnet. Da hier der Ausdruck „Rezeptor“ verwendet wird, soll kein Unterschied in der Bedeutung gemeint sein. Ein „Ligand-Rezeptor-Paar“ wird gebildet, wenn sich zwei Makromoleküle über molekulare Erkennung verbunden haben, um einen Komplex zu bilden.

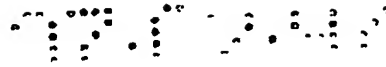
Andere Beispiele für Rezeptoren, die mit dieser Erfindung untersucht werden können, beinhalten, sind jedoch nicht beschränkt auf:

Mikroorganismus-Rezeptoren: Die Bestimmung von Liganden, die an Mikroorganismus-Rezeptoren binden, wie an spezifische Transportproteine oder Enzyme, die essentiell zum Überleben von Mikroorganismen sind, ist verwendbar bei der Entdeckung neuer Klassen oder Arten von Antibiotika. Von besonderem Wert wären Antibiotika gegen opportunistische Pilze, Protozoa und die Bakterien, die gegen die heute verwendeten Antibiotika resistent sind.

Enzyme: Beispielsweise ist die Bindungsstelle eines Enzyms, wie den Enzymen, die zur Spaltung von Neurotransmittern verantwortlich sind, ein Rezeptor. Die Bestimmung von Liganden, die an gewisse Enzyme binden und somit die Wirkung von Enzymen, die verschiedene Neurotransmitter spalten, modulieren, ist verwendbar in der Entwicklung von Arzneimitteln, die bei der Behandlung von Fehlfunktionen von Neurotransmittern verwendet werden können.

Antikörper: Beispielsweise kann die Erfindung bei der Untersuchung von Ligand-Bindungsstelle eines Antikörpermoleküls verwendbar sein, das sich mit dem Epitop eines Antigens von Interesse verbindet. Die Bestimmung einer Sequenz, die ein antigenes Epitop nachahmt, kann zu der Entwicklung von Vaccinen führen oder führt zu der Entwicklung verwandter diagnostischer Mittel oder Verbindungen, die in therapeutischen Behandlungen, wie für Autoimmunkrankheiten, verwendbar sind (z.B. Blockieren der Bindung der „Selbst-Antikörper“).

Nucleinsäuren: Die Erfindung kann verwendbar sein bei der Untersuchung von Sequenzen von Nucleinsäuren, die als Bindungsstellen für zelluläre Proteine wirken („trans-wirkende Faktoren“). Solche Sequenzen können z.B. Enhancer oder Promotorsequenzen beinhalten.



Katalytische Polypeptide: Polymere, vorzugsweise Polypeptide, die in der Lage sind, eine chemische Reaktion zu fördern, die die Umwandlung von einem oder mehreren Reaktanten zu einem oder mehreren Produkten beinhaltet, sind „katalytische Polypeptide“. Solche Polypeptide beinhalten in der Regel eine spezifische Bindungsstelle für mindestens einen Reaktanten oder ein Reaktionszwischenprodukt und eine aktive Funktionalität in der Nähe der Bindungsstelle, wobei diese Funktionalität in der Lage ist, den gebundenen Reaktanten chemisch zu modifizieren. Katalytische Polypeptide sind bei Lerner et al., *Science* 252: 659 (1991) beschrieben.

Hormonrezeptoren: Beispielsweise beinhalten „Hormonrezeptoren“ die Rezeptoren für Insulin und Wachstumshormon. Die Bestimmung der Liganden, die mit hoher Affinität an einen Hormonrezeptor binden, ist nützlich bei der Entwicklung beispielsweise eines oralen Ersatzes für die täglichen Injektionen, die Diabetiker machen müssen, um die Symptome von Diabetes zu lindern und in einem anderen Fall, als Ersatz für menschliches Wachstumshormon, das nur aus Kadavern oder durch rekombinante DNA-Technologie erhalten werden kann. Andere Beispiele beinhalten die vasokonstriktiven Hormonrezeptoren. Die Bestimmung von Liganden, die an jene Rezeptoren binden, kann zu der Entwicklung von Arzneimitteln zur Kontrolle des Blutdrucks führen.

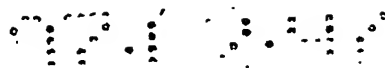
Opiatrezeptoren: Die Bestimmung von Liganden, die an Opiatrezeptoren im Hirn binden, ist verwendbar bei der Entwicklung von weniger süchtig-machenden Ersatzstoffen für Morphinum und verwandte Arzneimittel.

Substratträger oder fester Träger: Ein „Substratträger oder fester Träger“ ist ein Material mit einer starren oder halbstarren Oberfläche. Solche Materialien nehmen vorzugsweise die Form kleiner Perlen, Pellets, Scheiben oder anderer herkömmlicher Formen an, obwohl andere Formen verwendet werden können. In einigen Ausführungsformen ist mindestens eine Oberfläche des Substrats im wesentlichen flach. Eine annäherungsweise kugelige Form ist bevorzugt.

Synthetisch: Eine Verbindung ist „synthetisch“, wenn sie durch chemische oder enzymatische *in vitro*-Synthese hergestellt wird. Die erfindungsgemäßen synthetischen Bibliotheken können in Gegensatz gesetzt werden zu solchen in viralen Vektoren oder Plasmidvektoren, beispielsweise denjenigen, die in Bakterien, Hefe oder anderen lebenden Wirten vervielfältigt werden.

I. Verfahren zur Herstellung großer synthetischer Oligomer-Bibliotheken

- Ein allgemeines Verfahren zur Synthese von statistischen Oligomeren kann verwendet werden, um eine riesige Anzahl an Verbindungen herzustellen, die mit rekombinanten Systemen verfügbar sind, und um die Vielfalt des Monomersatzes zu nutzen, die mit chemischen Syntheseverfahren verfügbar ist. Man kann leicht bis zu 10^{12} verschiedene Oligomere herstellen, eine dramatische Verbesserung gegenüber den herkömmlichen Verfahren. Die vorliegende Erfindung liefert ein einfaches Mittel zur Identifizierung von Oligomeren.
- Das allgemeine Verfahren umfaßt die Herstellung einer großen, hoch unterschiedlichen Sammlung oder Bibliothek, wobei jedes Mitglied einer solchen Bibliothek eine einzelne Oligomersequenz (z.B. ein Peptid) umfaßt. Die Sequenz kann löslich oder kann an einen festen Träger gebunden sein. Falls sie an einen festen Träger gebunden ist, ist das Oligomer gewöhnlich mittels eines Linkers gebunden. Der Linker hat vor dem Binden eine geeignete funktionelle Gruppe an jedem Ende. Eine Gruppe ist für die Bindung an den Träger und die andere Gruppe für die Bindung an das Oligomer geeignet. Eine solche Sammlung kann beispielsweise alle Kombinationen von n Monomeren enthalten, die die Länge X haben, wobei n^X verschiedene Verbindungen erhalten werden. Die Sammlung kann auch Oligomere mit verschiedenen Monomereinheiten an beispielsweise nur einer oder einer geringen Zahl von Positionen enthalten, wobei an allen anderen Positionen die Sequenz identisch ist. Ein allgemeines Verfahren beinhaltet in der Regel das Synthetisieren der Oligomere in einer zufälligen kombinatorischen („stochastischen“) Art durch chemisches und/oder enzymatisches Zusammensetzen der Monomereinheiten.
- Eine synthetische Oligomer-Bibliothek kann hergestellt werden durch Synthetisieren an jeweils einer Vielzahl von festen Trägern einer einzelnen Oligomersequenz. Die Oligomersequenz ist verschieden bei den verschiedenen festen Trägern. Die Oligomersequenz wird in einem Verfahren synthetisiert, das die Schritte umfaßt: (a) Verteilung der Träger in einer stochastischen Weise unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen; (b) Aussetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß einem ersten Monomer; (c) Zusammenlegen der Träger; (d) Verteilen der Träger in einer stochastischen Weise unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen; (e) Aussetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß einem zweiten Monomer; und (f) Wiederholen der Schritte (a) bis (e) mindestens ein- bis zwanzigmal. In der Regel wird im wesentlichen die gleiche Anzahl an festen Trägern in jedes Reaktionsgefäß verteilt. Die Monomere können aus dem Satz von Aminosäuren gewählt werden und das erhaltene Oligomer ist ein Peptid.



Als ein spezielles Beispiel für das Verfahren kann man die Synthese von Peptiden ansehen, die drei Reste lang sind, und aus einem Monomersatz mit drei verschiedenen Monomeren zusammengesetzt sind: A, B und C. Das erste Monomer wird an drei verschiedene Aliquots von Perlen gekuppelt, wobei jedes unterschiedliche Monomer in einem unterschiedlichen Aliquot vorliegt und die Perlen aus allen Reaktionen werden sodann zusammengelegt (siehe Fig. 1). Der Pool (zusammengelegte Perlen) enthält nun annähernd die gleiche Anzahl an drei verschiedenen Arten von festen Trägern, wobei jede Art durch das Monomer in der ersten Position charakterisiert ist. Der Pool wird vermischt und auf die getrennten Monomer-Reaktionstöpfchen oder -gefäße mit A, B oder C als Monomer wiederverteilt. Sodann wird der zweite Rest angekuppelt.

Im Anschluß an diese Reaktion hat nun jedes Gefäß Perlen mit drei verschiedenen Monomeren in Position 1 und dem Monomer aus jedem einzelnen zweiten Reaktionsgefäß in Position 2. Alle Reaktionen werden dann wieder zusammengelegt, unter Herstellung eines Gemisches aus Perlen, die jeweils eines der neun möglichen Dimere tragen. Der Pool wird sodann unter den drei Reaktionsgefäßen verteilt, gekuppelt und zusammengelegt. Dieses Verfahren der sequenziellen Synthese und des Mischens ergibt Perlen, die alle möglichen Reaktionswege durchlaufen haben und die Sammlung an Perlen umfaßt alle Trimere von drei Aminosäuren ($3^3 = 27$). Somit wird ein kompletter Satz an Trimeren aus A, B und C konstruiert. Wie leicht zu sehen ist, hilft die Verwendung einer genügend großen Anzahl an Syntheseperlen sicherzustellen, daß der Satz der verschiedenen Kombinationen an Monomeren, die in diesem zufälligen, kombinatorischen Syntheschema angewendet werden, vollständig repräsentiert ist.

Diese Verfahren zum Zusammensetzen von Oligomeren aus vielen Arten von Monomeren erfordert die Verwendung von geeigneter Kupplungschemie für einen gegebenen Satz an Monomereinheiten oder Aufbaublöcken. Jeder Satz an Aufbaublöcken, der in einer Schritt-bei-Schritt-Art aneinander gebunden werden kann, kann als Monomersatz dienen. Die Bindung kann mit chemischen, enzymatischen oder anderen Mitteln oder durch eine Kombination jedes dieser Mittel vermittelt werden. Die sich ergebenden Oligomere können linear, cyclisch, verzweigt, oder sie können verschiedene andere Konformationen annehmen, wie für den Fachmann offensichtlich ist. Verfahren zur Festphasensynthese von Polypeptiden sind beispielsweise bei Merrifield, *supra*, beschrieben. Peptid-Kupplungschemie ist auch in *The Peptides*, Vol. 1 (Eds. Gross E., und J. Meienhofer, Academic Press, Orlando (1979)) beschrieben.

Um die Oligomere zu synthetisieren, wird eine Sammlung einer großen Anzahl an festen Trägern unter einer Anzahl an Reaktionsgefäßen aufgeteilt. In jeder Reaktion wird ein

unterschiedliches Monomer an die wachsende Oligomerkette angekuppelt. Die Monomere können von jeder Art sein, die für die chemische Kupplung geeignet aktiviert werden kann oder bei der enzymatischen Kupplung akzeptiert wird. Da die Reaktionen in getrennten Reaktionsgefäßen enthalten sein können, können sogar Monomere mit unterschiedlicher Kupplungschemie verwendet werden, um die Oligomere zusammenzusetzen (siehe The Peptides, supra). Die Kupplungszeit für einige Monomersätze kann lang sein. Daher ist die bevorzugte Anordnung diejenige, in der die Monomerreaktionen parallel ausgeführt werden. Nach jedem Kupplungsschritt werden die festen Träger zusammengelegt, an denen die Oligomere der Bibliothek synthetisiert werden, und vor der Wiederverteilung in die einzelnen Reaktionsgefäße für den nächsten Kupplungsschritt gemischt. Dieses Mischverfahren liefert feste Träger mit vielen Oligomer-Sequenzkombinationen. Wenn jeder Syntheseschritt eine hohe Kupplungseffizienz hat, dann haben im wesentlichen alle Oligomere an einem einzelnen festen Träger dieselbe Sequenz. Diese Sequenz wird durch den Syntheseweg (Art und Sequenz der Monomerreaktionen) für einen gegebenen festen Träger am Ende der Synthese bestimmt. Die maximale Länge der Oligomere ist in der Regel weniger als etwa 20, gewöhnlich von 3 bis 8 Resten Länge. In einigen Fällen kann jedoch eine Länge von 10 bis 12 Resten bevorzugt sein. Bekannte Schutzgruppen können verwendet werden, um falsche Kupplung zu verhindern (siehe The Peptides, Vol. 3 (Eds. Gross E., und J. Meienhofer, Academic Press, Orlando (1981))). Modifikationen dieses vollständig zufälligen Ansatzes sind ebenfalls möglich. Beispielsweise kann der Monomersatz von Schritt zu Schritt erweitert oder verringert werden; oder der Monomersatz kann für den nächsten Schritt komplett ausgewechselt werden (z.B. Aminosäuren in einem Schritt, Nucleoside in einem anderen, Kohlenhydrate in wieder einem anderen Schritt), falls die Kupplungschemie verfügbar wäre (siehe Gait, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1984); Friesen und Danishefsky, J. Amer. Chem. Soc. 111: 6656 (1989) und Paulsen, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 25: 212 (1986). Monomereinheiten für die Peptidsynthese können beispielsweise einzelne Aminosäuren oder größere Peptideinheiten oder beides beinhalten. Eine Variation ist, einige Pools mit verschiedenen Sequenzen an festen Trägern zu bilden, die unter verschiedenen Monomersätzen geteilt werden bei gewissen Schritten der Synthese. Mit diesem Ansatz kann man auch Oligomere mit verschiedenen Längen mit entweder verwandten oder nicht-verwandten Sequenzen aufbauen und man kann bestimmte Monomerreste an einigen Positionen festhalten, während die anderen Reste variieren, um Oligomerrahmen zu konstruieren, in denen bestimmte Reste oder Regionen verändert werden, um für Vielfalt zu sorgen.

Die chemische oder enzymatische Synthese von erfindungsgemäßen Oligomer-Bibliotheken findet in der Regel an festen Trägern statt. Der Ausdruck „fester Träger“, wie er hier verwendet wird, umfaßt ein Teilchen mit geeigneten Stellen für die Oligomersynthese und,

in einigen Ausführungsformen, für die Bindung und/oder Synthese des Tags. Es gibt einige feste Träger, die bei der Herstellung der erfindungsgemäßen synthetischen Oligomer-Bibliotheken verwendbar sind. Feste Träger werden herkömmlich bei der Festphasensynthese von beispielsweise Peptiden und Nucleinsäuren und anderen Oligomeren, wie vorstehend aufgezählt, verwendet und sind somit bekannt.

Mit genügend festen Trägern und effizientem Kuppeln kann man die kompletten Sätze bestimmter Oligomere, falls es erwünscht ist, herstellen. Allgemein liegt die Größe des festen Trägers im Bereich von 1 nm bis 100 µm, es kann jedoch ein größerer fester Träger mit bis zu 1 mm Größe verwendet werden. Die geeignete Größe für den festen Träger hängt von (1) der Anzahl an Oligomersynthesestellen und den erwünschten Bindungsstellen des Identifizierungs-Tags, (2) der Anzahl an verschiedenen zu synthetisierenden Verbindungen (und der Anzahl an festen Trägern, die die jeweiligen Oligomere, die für die Durchmusterung benötigt werden, tragen); und (3) der Wirkung auf die Größe der festen Träger bei bestimmten Durchmusterungsstrategien [z.B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierer (FACS)], die verwendet werden, ab.

In einem speziellen Beispiel können feste Träger mit 1 µm Durchmesser verwendet werden. Wenn jede Reaktion ca. 0,2 ml feste Träger enthält, und die Oligomere aus einem Satz von 50 Monomeren (50 parallele Reaktionen) synthetisiert werden, dann wären insgesamt 10 ml feste Träger oder ca. 10^{13} feste Träger erforderlich. Wenn es erwünscht ist, Hexamere mit diesen 50 Monomeren herzustellen, dann gibt es mehr als $1,5 \times 10^{10}$ mögliche Sequenzen und jede spezielle Sequenz wäre an etwa 10^3 festen Trägern vertreten. Eine geschätzte Kapazität jeder Perle, basierende auf der Kapazität herkömmlich verwendeter Peptidsynthese-Harze liegt bei etwa 0,1 pg Peptid pro Perle. Mit dieser Schätzung hätte dann jeder feste Träger etwa 10^8 Oligomerketten.

Um die Effizienzen beim Waschen zu verbessern, sind feste Träger bevorzugt, die weniger porös als übliche Peptidsynthese-Harze sind. Diese Träger haben eine niedrigere Dichte von wachsenden Ketten, jedoch können sogar mit einem Abnehmen der Kapazität um einige Größenordnungen, ausreichende Oligomerdichten für effizientes Durchmusteren hergestellt werden. Mit weniger porösen Trägern ist ein größerer Anteil an Oligomeren für die Bindung an den Rezeptor während des Durchmusterungsverfahrens verfügbar. Außerdem vermindern die weniger porösen Träger das Hinübertragen von Tags aus einer Reaktion zu der nächsten, wobei die Genauigkeit des Ablesens der dominanten (korrekten) Tags verbessert wird.

Solche festen Träger können jede Form haben, obwohl sie vorzugsweise annähernd kugelförmig sind. Die Träger müssen nicht notwendigerweise in Größe, Form oder Zusammensetzung homogen sein, obwohl die Träger gewöhnlich und vorzugsweise einheitlich sind. In einigen Ausführungsformen können Träger, die sehr einheitlich in der Größe sind, besonders bevorzugt sein. In einer anderen Ausführungsform jedoch können zwei oder mehr deutlich verschiedene Populationen von festen Trägern für gewisse Zwecke verwendet werden.

Feste Träger können aus vielen Materialien bestehen. Diese sind hauptsächlich durch die Kapazität für die Derivatisierung zum Binden jeder einer Anzahl von chemisch reaktiven Resten und der Kompatibilität mit der Chemie für die Oligomersynthese und das Binden des Tags beschränkt. Geeignete Trägermaterialien beinhalten Glas, Latex, stark vernetztes Polystyrol oder ähnliche Polymere, Gold oder andere kolloidale Metallteilchen und andere bekannte Materialien. Außer es ist anders beschrieben, können die chemisch reaktiven Reste, mit denen solche festen Träger derivatisiert werden können, diejenigen sein, die herkömmlich bei der Festphasensynthese der jeweiligen Oligomere verwendet werden und sind somit bekannt. Die erfindungsgemäß verwendeten festen Träger beinhalten keine lebenden Zellen, Viren oder Vektoren zum Klonen, wie Phagenvektoren oder Plasmide.

II. Verfahren zum Herstellen getaggtter synthetischer Oligomer-Bibliotheken

Die die Bibliothek umfassenden Oligomere sind auch an ein Identifizierungs-Tag gebunden, das leicht decodiert werden kann, um die Sequenz jedes Oligomers aufzuzeichnen. Die Identifizierungs-Tags können entweder an das Oligomer oder den festen Träger, an den das Oligomer gebunden ist, gebunden sein. Die Bindung ist vorzugsweise mittels eines Linkers, der vor der Bindung eine geeignete funktionelle Gruppe an jedem Ende hat, wobei eine Gruppe für die Bindung an den Träger und die andere Gruppe für die Bindung an das Identifizierungs-Tag geeignet ist. Alternativ kann das Identifizierungs-Tag an ein Monomer gebunden sein, das in das Oligomer einverleibt ist oder direkt an denselben Linker gebunden ist, der das Oligomer an den festen Träger bindet. In der letzteren Ausführungsform hat der Linker vor der Bindung eine dritte funktionale Gruppe, die für die Bindung des Identifizierungs-Tags geeignet ist.

Eine synthetische Oligomer-Bibliothek, die Identifizierungs-Tags beinhaltet, wird durch Synthese einer einzelnen Oligomersequenz an jeweils einer Vielzahl von festen Trägern hergestellt und eines oder mehrere Identifizierungs-Tags identifizieren die Oligomersequenz. Die getaggte synthetische Oligomer-Bibliothek wird in einem Verfahren hergestellt, das die Schritte umfaßt: (a) Verteilung der Träger unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen; (b) Aussetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß einem ersten Oligomer-Monomer und einem

ersten Identifizierungs-Tag-Monomer; (c) Zusammenlegen der Träger; (d) Verteilung der Träger unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen; und (e) Aussetzen der Träger einem zweiten Oligomer-Monomer und einem zweiten Identifizierungs-Tag-Monomer. Wie vorstehend beschrieben, kann die Erfindung auch in einer Weise ausgeführt werden, in der es keinen festen Träger gibt. Bei dieser Ausführung wird das Tag direkt an das zu synthetisierende Oligomer gebunden. Die Schritte des jeweiligen Verfahrens werden in der Regel ein- oder mehrmals, jedoch gewöhnlich weniger als zwanzigmal wiederholt.

Die festen Träger können einem Oligomer-Monomer und einem Identifizierungs-Tag zur selben Zeit oder sequentiell ausgesetzt werden (oder damit gekuppelt werden). In jedem Fall werden die Träger sodann zusammengelegt und dem zweiten Oligomer-Monomer und dem zweiten Identifizierungs-Tag ausgesetzt. Wie vorstehend werden diese Schritte wiederholt, in der Regel von ein- bis etwa zwanzigmal. Die Erfindung wird hier hauptsächlich in bezug auf die Herstellung von Molekülen mit Sequenzen von Aminosäuren beschrieben. Die Erfindung kann jedoch leicht auf die Herstellung anderer Oligomere angewendet werden und jeder Satz von Verbindungen kann in einer Baustein-bei-Baustein-Art synthetisiert werden, wie dem Fachmann bekannt ist.

In einer anderen Ausführungsform wird der feste Träger für die Synthese aller Mitglieder der Bibliothek verwendet. Die Mitglieder werden jedoch von dem Träger vor der Durchmusterung abgespalten. In dieser Ausführungsform kann die Synthese von getaggten Oligomeren unter Verwendung von in großem Maßstab immobilisierter Polymersyntheseverfahren (VLSIPSTTM) erreicht werden. Siehe US-PS 5,143,854 und PCT-Patentveröffentlichung Nr. 92/10092. Eine Ansammlung von Oligonucleotiden wird an dem VLSIPSTTM-Chip synthetisiert. Jedes Oligonucleotid ist über eine spaltbare Gruppe, wie eine Disulfidgruppe, an den Chip gebunden. In einer Ausführungsform hat jedes Oligonucleotid-Tag eine Aminogruppe am freien Ende und enthält nur Pyrimidin oder Pyrimidin und Purin-analoge Basen. Zusätzlich enthält jedes Oligonucleotid Bindungsstellen für die Vervielfältigung, d.h. PCR-Primer-Stellen und wahlweise eine Sequenzierungs-Primer-Stelle. Ein kurzer Abschnitt jedes Oligonucleotids codiert einzigartig für die Monomersequenz des zu taggenden Oligomers. Dann werden beispielsweise Peptide synthetisiert, gegebenenfalls von den freien terminalen Aminogruppen an jedem Oligonucleotid, so daß jedes Peptid an ein Tag gebunden ist. Die gesamte Sammlung an Oligonucleotid-Peptiden kann von dem Chip losgelöst werden, um eine lösliche getaggte Oligomer-Bibliothek zu erzeugen.

Bevorzugter jedoch wird die Oligomer-Bibliothek an Perlen oder Teilchen gebildet. Ein Verfahren der Perlenfunktionalisierung mit kompatibler Chemie für die Peptidsynthese und die Runden-bei-Runden-Bindung der Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags ist in den Fig.

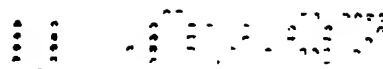
3.1 bis 3.6 gezeigt. Glasperlen werden unter Verwendung von Aminopropyltriethoxysilan derivatisiert und ein beta-Alanin-Abstandshalterrest wird mit dem aktivierten Ester-Verfahren gekuppelt. Die Oligonucleotid-Tags können gegebenenfalls in eine Biotingruppe eingefügt werden, um die Reinigung, Hybridisierung, Vervielfältigung oder Detektion zu vereinfachen (siehe Pierce ImmunoTechnology Catalog and Handbook, 1991. Kommerziell erhältliche Fmoc-geschützte Aminosäuren und Standard-BOB-Kupplungsschemie wird für die Peptidsynthese verwendet (siehe The Peptides, *supra*). Geschütztes Polypyrimidin (z.B. Cytidin-geschützt als N⁴-Bz-C) und/oder Purinanaloga-haltige Oligonucleotide, die resistent gegen die Kupplungsreagenzien und die Reagenzien zum Entfernen der Schutzgruppen sind, die in der Peptidsynthese verwendet werden, werden mittels Maleimidchemie an die unmaskierten Thiolgruppen gebunden, die in die wachsenden Peptidketten mit einer niedrigen Frequenz (d.h. 0,1%) als Cysteinreste mit maskierten Thiolgruppen eingefügt werden (wobei die Masken selektiv vor dem Taggen entfernt werden können). In anderen erfindungsgemäßen Ausführungsformen könnte die Verwendung von geschützten Nucleosiden oder Oligonucleotiden nicht notwendig sein.

Um jedoch die Integrität eines Oligonucleotid-Tags während der Peptidsynthese zu erhalten, kann es notwendig sein, verschiedene Kombinationen von Schutzgruppen und/oder synthetischen Nucleotiden zu verwenden, um den Abbau des Tags oder des synthetisierten Oligomers zu verhindern. Im allgemeinen sind Polypyrimidin-Oligonucleotid-Tags relativ stabil unter den typischen Peptidsynthesebedingungen, im Gegensatz zu Oligonucleotid-Tags, die natürliche Purinnucleotide enthalten, jedoch kann ein Polypyrimidin-Nucleotid-Tag einigermaßen schwierig mit PCR zu vervielfältigen sein. Es kann notwendig sein, Purinbasen oder Analoga, die auf ihre Fähigkeit, den Bedingungen bei der Peptidkupplung (und dem Entfernen der Schutzgruppen) getestet wurden, in das Tag einzufügen, um die gewünschte Effizienz bei der Vervielfältigung zu erreichen. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung kann das Tag gegebenenfalls von 10 bis 90%, vorzugsweise 35 bis 50% und insbesondere 33 bis 35% Purin oder Purinanaloga-Nucleotide enthalten. Die Oligonucleotide können gegebenenfalls Phosphatschutzgruppen (z.B. O-Methylphosphate) mit einer höheren Basenstabilität als die Standard-beta-Cyanoethylgruppe, die anfällig gegenüber der Piperidinspaltung sein kann, enthalten. In solchen Fällen kann die Entfernung der Schutzgruppe von dem Peptid und Oligonucleotid durch sequentielle Behandlung mit Thiophenol, Trifluoressigsäure und ethanolischem Ethylendiamin bei 55°C bewirkt werden. In einer anderen Ausführungsform werden photolabile alpha-Aminoschutzgruppen in Verbindung mit Basen-labilen Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren und Standard-beta-Cyanoethylschutzgruppen für die Oligonucleotid-Tags verwendet.

In einer anderen Ausführungsform können Oligonucleotide mit sowohl modifizierten oder synthetischen Purinen und Pyrimidinen parallel mit Peptiden synthetisiert werden, unter Verwendung von herkömmlichen Fmoc/-^tBu-geschützten Aminosäuren. In diesem Verfahren kann man auch O-Allyl- und N-Allyloxycarbonylgruppen verwenden, um die Phosphatsauerstoffatome und die exocyclischen Amine der Nucleosidbasen jeweils zu schützen (siehe Hayakawa et al., J. Amer. Chem. Soc. **112**: 1691-1696, 1990). Durch Anwenden des milden Oxidationsmittels ^tBuOOH für die Oxidation am Phosphor kann man die Oxidation der Aminosäuren Methionin, Tryptophan und Histidin minimieren (siehe Hayakawa et al., Tetr. Lett. **27**: 4191-4194, 1986). Die Verwendung von Pyridiniumhydrochlorid/Imidazol als ein Phosphoramiditaktivator führt zu der selektiven 5'-O-Phosphitylierung auf Kosten von niedrigen Anteilen an falscher Reaktion am Stickstoff an dem Peptid oder Oligonucleotid (siehe Gryaznov und Letsinger, Nucleic Acids Research **20**: 1879-1882, 1992). Die Stabilität der Purinnucleotide gegenüber starker Säure (z.B. TFA) wird durch Verwendung von Phosphoramiditen der Purinnucleosidanaloga 7-Deaza-2'-deoxyadenosin und 7-Deaza-2'-deoxyguanosin verhindert (siehe Barr et al., BioTechniques **4**: 428-432, 1986, und Scheit, Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function, Seiten 64-65 (John Wiley and Sons, New York)).

Die vollständig zusammengesetzten Peptid- und Oligonucleotidketten können zuerst durch Behandlung der Produkte mit 30% Piperidin in DMF, um die Amino-terminalen Fmoc-Gruppen zu entfernen, von den Schutzgruppen befreit werden. Dann werden die allylischen Schutzgruppen entfernt unter Verwendung von THF, das Tris-(dibenzylidenaceton)-dipaladium-chloroform-Komplex enthält, Triphenylphosphin und n-Butylamin/Ameisensäure, gefolgt von einem Waschschriff mit THF, einem Waschschriff mit wäßrigem Natrium-N,N-diethyldithiocarbamat und einen Waschschriff mit Wasser. Am Schluß werden die Säure-lablen Aminosäureschutzgruppen durch Behandlung mit 95:5 TFA/Wasser entfernt.

Andere Verfahren liefern ebenfalls einen wirksamen orthogonalen Schutz während des parallelen Zusammensetzens der Oligonucleotide und der Peptide. Diese Verfahren beinhalten die Verwendung von Säure-lablen Schutzgruppen an den Phosphaten und den exocyclischen Aminen von Deoxycytidin, 7-Deaza-deoxyadenosin und 7-Deaza-deoxyguanosin, die ausreichend stabil sind, um der 3% Trichloressigsäure zu widerstehen, die bei der 5'-O-Deotritylierung verwendet wird. Weiterhin beinhalten diese Verfahren die Verwendung von photochemisch entfernbaren Schutzgruppen an diesen Resten und Kombinationen von solchen Säuren und photolablen Resten (für photolabile Schutzgruppen für Phosphate siehe Baldwin et al., Tetr. Lett. **46**: 6879-6884 (1990), siehe auch Fig. 5).



III. Identifizierung der Sequenz jedes Oligomers

Die vorliegende Erfindung liefert ein Verfahren zur Identifizierung der Zusammensetzung und der Sequenz jedes Oligomers in der Bibliothek. Durch Verfolgen des synthetischen Wegs, den jedes Oligomer beschritten hat, kann man auf die Sequenz der Monomere jedes Oligomers zurückschließen. Das Verfahren beinhaltet das Binden eines Identifizierungs-Tags an das Oligomer, das die Monomerreaktionen und die entsprechenden Schrittzahlen anzeigt, die jedes Oligomer in der Bibliothek definieren. Nach einer Reihe von Syntheseschritten (und gleichzeitiger Zugabe von Identifizierungs-Tags) „liest“ man die mit einem Oligomer assoziierten Identifizierungs-Tag(s), um die Sequenz dieses Oligomers zu bestimmen.

Beispielsweise kann man mikroskopisch erkennbare alphanumerische Tags an jede Perle binden (siehe Fig. 2): „A1“ bedeutet, daß die Perle an einer A-Monomerreaktion bei Schritt 1 teilgenommen hat, „C2“ bedeutet, daß die Perle an einer C-Monomerreaktion an Schritt 2 teilgenommen hat und „B3“ bedeutet, daß B-Monomer in Schritt 3 zugegeben wurde, usw. Am Ende der 3-Schritt-Synthese hätte die Perle 3 Tags gebunden, z.B. A1, C2 und B3, was andeutet, daß die Sequenz der Peptide an der Perle ACB ist. Dieses Schema erfordert eine Anzahl verschiedener Identifizierungs-Tags maximal gleich dem Produkt der Anzahl verschiedener Monomere und der Anzahl der Syntheseschritte (neun in diesem Beispiel). Die Anzahl an Identifizierungs-Tags ist reduziert, wenn die Symbole aneinander in der Reihenfolge der Schritte gebunden sind: A, A-C, A-C-B. In diesem Fall sind nur so viele Identifizierungs-Tags wie Monomere notwendig. Der Identifizierungs-Tag wird im wesentlichen in derselben Weise aufgebaut, wie die Peptide, um die Aufzeichnung darüber zu erhalten, welches Monomer zugegeben wurde und in welchem Additionsschritt.

Die Identifizierungs-Tags davon identifizieren die jeweilige Monomerreaktion, die ein individuelles Mitglied der Bibliothek oder der feste Träger durchlaufen hat und zeichnet den Schritt in der Synthesereihe auf, in dem das jeweilige Monomer zugegeben wurde. Die Tags können unmittelbar davor, während oder nach der Monomerzugabe-Reaktion gebunden werden, wie es zweckmäßig und kompatibel mit der Art des Identifizierungs-Tags, der Arten der Bindung und der Chemie der Oligomersynthese ist. Das Identifizierungs-Tag wird zugegeben, wenn die festen Träger, die einen spezifischen Monomeradditionsschritt durchlaufen haben, physikalisch zusammen sind und so als eine Gruppe markiert werden können, d.h. vor dem nächsten Schritt des Zusammenlegens.

In einigen Fällen kann es selbstverständlich, wenn nur eine geringe Anzahl an Monomereinheiten eines Oligomers variiert wird, kann es notwendig sein, nur diejenigen

Monomere zu identifizieren, die unter den Oligomeren variieren, wie wenn man nur einige Aminosäuren in einem Peptid variieren möchte. Beispielsweise könnte man nur 3 bis 6 Aminosäuren in einem Peptid, das 6 bis 12 Aminosäuren lang ist, variieren, oder man möchte nur 5 Aminosäuren in Polypeptiden, die bis zu 50 Aminosäuren lang sind, ändern.

5 Man kann die Sequenz jedes Peptids einzigartig identifizieren, indem man für jeden festen Träger ein Identifizierungs-Tag zur Verfügung stellt, das nur die Aminosäuren, die in jeder Sequenz variiert sind, spezifiziert, was dem Fachmann leicht verständlich ist. In solchen Fällen können alle festen Träger in demselben Reaktionsgefäß für die Zugabe gemeinsamer Monomereinheiten verbleiben und können für die Zugabe der unterscheidenden

10 Monomereinheiten auf verschiedene Reaktionsgefäße verteilt werden.

Das Identifizierungs-Tag kann mit einem Oligomer über eine Vielfalt von Mechanismen, entweder direkt, über ein verknüpfendes Molekül oder über einen festen Träger, an dem das Oligomer synthetisiert wird, assoziiert sein. Bei der letzteren Art könnte das Tag auch an

15 einen weiteren festen Träger gebunden sein, der wiederum an den festen Träger, an dem das Oligomer synthetisiert wird, gebunden ist.

IV. Arten von Identifizierungs-Tags

20 Das Identifizierungs-Tag kann jedes erkennbare Merkmal sein, d.h. zum Beispiel mikroskopisch unterscheidbar in Form, Größe, Farbe, optischer Dichte, etc.; unterschiedlich beim Absorbieren oder Emittieren von Licht; chemisch reaktiv; magnetisch oder elektronisch codiert; oder in einer anderen Weise mit der erforderlichen Information klar markiert und bei einem Level von einem (oder wenigen) festen Trägern entschlüsselbar. In einer

25 Ausführungsform beinhaltet jede Perle oder ein anderer fester Träger in der Bibliothek eine Vielzahl von Fluorophoren oder anderen Licht-ansprechbaren Arten von Molekülen, deren spektrale Eigenschaften verändert werden können und daher zur Speicherung von Information verwendet werden können. In einer solchen Art beinhaltet eine Perle eine Vielfalt von Fluorophoren, die jeweils selektiv photobleichbar sind und so unfähig für

30 Fluoreszenz werden oder in der Fluoreszenz abnehmen. Während jedes Kupplungsschritts wird die Perle bestrahlt (oder nicht), um einen oder mehrer bestimmte Arten von Fluorophoren photozubleichen (oder nicht), womit die Identität des Monomers in dem synthetisierten Oligomer aufgezeichnet wird. Siehe Science 255: 1213 (6. März 1992).

35 Man kann mikroskopisch identifizierbare Tags als kleine Perlen von erkennbar unterschiedlichen Größen, Formen oder Farben oder mit Strichcodes (bar codes) markiert, konstruieren. Die Tags können „maschinenlesbare“ Lumineszenzmarkierungen oder radioaktive Markierungen sein. Der Identifizierungs-Tag kann auch eine codierbare molekulare Struktur

sein. Die Information kann in der Größe (z.B. Länge eines Polymers) oder der Zusammensetzung des Moleküls codiert sein. Das beste Beispiel für die letztere Art von Tag ist eine Nucleinsäuresequenz, d.h. RNA oder DNA, die aus natürlichen oder modifizierten Basen zusammengesetzt ist.

5

Synthetische Oligodesoxyribonucleotide sind insbesondere bevorzugte informationstragende Identifizierungs-Tags. Oligonucleotide sind ein natürliches, hochdichtes Informationsspeichermedium. Die Identität der Art des Monomers und des Zugabeschritts wird einfach in einer kurzen Oligonucleotidsequenz codiert und beispielsweise an jede Peptidsynthese-Perle angehängt. Wenn eine einzelne Perle durch Durchmusterung isoliert wird, z.B. für Rezeptorbindung, können die gebundenen Oligonucleotide mit Verfahren, wie PCR, vervielfältigt werden (siehe PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, (Innis, M., Gelfand D., Sninsky, J. und White, T., Academic Press, San Diego 1990) oder sie können mit anderen Nucleinsäure-Vervielfältigungsverfahren, wie die Ligase-Kettenreaktion oder das selbst-erhaltende Sequenz-Replikationssystem vervielfältigt werden. Das vervielfältigte Produkt kann einfach sequenziert oder anders identifiziert werden, um die Identität des Peptids an der Perle zu decodieren. Für diesen Zweck kann man jede einer Vielfalt von Sequenzierungsmethoden verwenden, einschließlich das Sequenzieren mit Sequenz-spezifischer Sondenhybridisierung.

20

Alternativ kann die Information eher in der Länge als in der Sequenz, oder zusätzlich zu der Sequenz des Oligonucleotids codiert sein. Wenn nur die Länge des Oligonucleotids verwendet wird, um jede spezifische Monomierzugabe zu dem Oligomer darzustellen, dann kann die Identität des Oligomers durch Vervielfältigen des Oligonucleotids decodiert werden, wie vorstehend beschrieben, und die Markierungen werden über jede einer Vielzahl von Größentrennungsmethoden identifiziert, einschließlich Polyacrylamidgelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese.

25

Es gibt verschiedene Arten, in denen Oligonucleotide als Identifizierungs-Tags verwendet werden können. Die Oligonucleotide können vor, während oder nach dem entsprechenden Oligomer-(z.B. Peptid)-Syntheseschritt Base-bei-Base zusammengesetzt werden. In einem Fall der Base-bei-Base-Synthese ist das Tag für jeden Schritt ein einzelnes Nucleotid oder höchstens sehr wenige Nucleotide (d.h. 2 bis 5). Diese Strategie erhält die Reihenfolge der Schritte in der linearen Anordnung der Oligonucleotid-Kette, die parallel mit dem Oligomer wächst. Um die chemische Kompatibilität der parallelen Syntheseschritte (z.B. Oligonucleotide und Peptide) zu erhalten, kann man die Standard-Syntheschemien modifizieren.

35

Eine Variation der Basen-bei-Basen-Zusammensetzung ist der Block-bei-Block-Ansatz. Codierte Sätze an Nucleotiden („Codons“) von 5 bis 10 oder mehr Basen werden als geschützte, aktivierte Blöcke zugegeben. Jeder Block trägt die Information der Monomer-Art und die Reihenfolge der Zugabe repräsentiert die Reihenfolge der Monomer-Zugabe-reaktion. Alternativ kann der Block die Oligomersynthese-Schrittzahl genauso wie die Information der Monomer-Art codieren.

Man kann auch geschützte (oder ungeschützte) Oligonucleotide mit Vervielfältigungs-Primer-Stellen, Monomer-spezifischer Information und Reihenfolge-der-Zugabe-Information anhängen, die von 10 bis 50 bis 150 Basen lang sind bei jedem Schritt. Am Ende einer Reihe von n Oligomer-Syntheseschritten gäbe es n unterschiedlich codierte Sätze an Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags, die mit jeder Oligomersequenz assoziiert sind. Nach dem Identifizieren der Oligomere mit Liganden-Aktivität werden die assoziierten Oligonucleotide mit PCR vervielfältigt und sequenziert, um die Identität des Oligomers zu decodieren.

V. Bindung der Identifizierungs-Tag(s) an das Oligomer

Die Identifizierungs-Tags können an chemisch reaktive Gruppen (z.B. unmaskierte Thiole oder Amine) an der Oberfläche eines Syntheseträgers gebunden sein, der funktionalisiert ist, um die Synthese eines Oligomers und die Bindung oder die Synthese der Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags zu ermöglichen. Die Tags könnten auch an Monomere gebunden sein, die in einem geringen Anteil in die Oligomer-Ketten oder als caps in einer geringen Anzahl der Oligomer-Ketten oder als reaktive Stellen an den Linkern, die die Oligomer-Ketten mit dem festen Träger verbinden, einverleibt sein.

In einer Ausführungsform haben die festen Träger chemisch reaktive Gruppen, die unter Verwendung zwei verschiedener oder „orthogonaler“ Arten von Schutzgruppen geschützt sind. Die festen Träger werden dann einem ersten Mittel zum Entfernen der Schutzgruppe oder einem Aktivator ausgesetzt, wobei die erste Art von Schutzgruppe von beispielsweise den chemisch reaktiven Gruppen entfernt wird, die als Stellen für die Oligomersynthese dienen. Nach der Reaktion mit dem ersten Monomer werden die festen Träger dann einem zweiten Aktivator ausgesetzt, der die zweite Art von Schutzgruppen entfernt, wobei beispielsweise die chemisch reaktiven Gruppen freigesetzt werden, die als Bindungsstellen für das Identifizierungs-Tag dienen. Einer oder beide Aktivatoren können in einer Lösung sein, die mit den Trägern in Kontakt gebracht wird.

In einer anderen Ausführungsform kann der Linker, der das Oligomer und den festen Träger verbindet, chemisch reaktive Gruppen haben, die mit der zweiten Art von Schutzgruppe

geschützt ist. Nach der Reaktion mit dem ersten Monomer wird der feste Träger, der den Linker und das „wachsende“ Oligomer trägt, einem zweiten Aktivator ausgesetzt, der die zweite Art von Schutzgruppe entfernt, wobei die Stelle, die das Identifizierungs-Tag direkt an den Linker bindet, freigesetzt wird, eher als die direkte Bindung an den festen Träger.

5

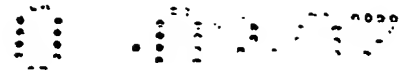
Falls Aktivatoren oder Mittel zum Entfernen der Schutzgruppe in das Verfahren zur Herstellung der synthetischen Peptid-Bibliothek mit einer Vielfalt von verschiedenen Mitgliedern einverleibt werden, wobei jedes Mitglied einen festen Träger umfaßt, an den eine unterschiedliche einzelne Peptidsequenz und ein Oligonucleotid-Identifizierungs-Tag zum Identifizieren der Peptidsequenz gebunden ist, umfaßt das Verfahren: a) Verteilung der festen Träger auf eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen; b) Umsetzen der festen Träger mit einer Lösung in jedem Reaktionsgefäß und sequenzielles Behandeln mit (1) einem ersten Aktivator, um eine erste Art von Schutzgruppe von dem festen Träger zu entfernen, (2) einer ersten Aminosäure oder einem Peptid, um die Aminosäure oder das Peptid an den festen Träger an den Stellen, an denen die erste Art von Schutzgruppe entfernt wurde, zu kuppeln, (3) einem zweiten Aktivator, um eine zweite Art von Schutzgruppe von dem festen Träger zu entfernen, und (4) einem ersten Nucleotid- oder Oligonucleotid-Tag, um das Tag an den Stellen, an denen die zweite Art von Schutzgruppe entfernt wurde, zu kuppeln; c) Zusammenlegen der Träger; d) Aufteilen der zusammengelegten festen Träger auf eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen, und e) Wiederholen des Schritts b), um eine zweite Aminosäure oder ein Peptid und ein zweites Nucleotid- oder Oligonucleotid-Tag an den festen Träger zu kuppeln.

Wie vorstehend erwähnt, kann die Erfindung auch in der Weise durchgeführt werden, in der es keinen festen Träger gibt und das Tag direkt (oder über einen Linker) an das Oligomer gebunden ist, das synthetisiert wird. Die Größe und Zusammensetzung der Bibliothek wird durch die Anzahl an Kupplungsschritten und die während der Synthese verwendeten Monomere bestimmt. Der Fachmann erkennt, daß entweder das Tag oder das Monomer in der jeweiligen Ausführungsform zuerst gekuppelt werden kann.

30

Eine weitere mögliche Ausführungsform ist die Verwendung von zwei festen Trägern, wie Perlen, die physikalisch verbunden sind, einerseits mit Synthesestellen (oder Linkern) für die Oligomere und andererseits mit Bindungsstellen (oder Linkern) für die Identifizierungs-Tags. Diese Anordnung erlaubt die Trennung von Oligomeren und Identifizierungs-Tags in diskrete „Zonen“ und erlaubt die Verwendung stark unterschiedlich chemisch reaktiver Gruppen und Chemien für die Bindungen. Die festen Träger können separat derivatisiert sein und dann unter Bedingungen verknüpft sein, bei denen alle oder annähernd alle festen Träger der Synthese einen Tag-Bindungs-festen Träger im Schlepptau haben. Die festen

35



Träger können unterschiedliche Größen haben, wie beispielsweise eine große Syntheseperle mit einigen (oder vielen) daran gebundenen kleineren Tag-Bindungs-Perlen. In einer Ausführungsform hat der erste feste Träger mindestens eine daran gebundene Aminosäure und der zweite feste Träger mindestens ein daran gebundenes Nucleotid.

5

Die Art der Verknüpfung der beiden Perlen ist durch die Chemie der Oligomersynthese beschränkt. Das offensichtlichste Mittel der Verknüpfung der Perlen ist mit einem heterobifunktionalen Vernetzungsmittel (für Beispiele solcher Mittel siehe Pierce ImmunoTechnology Catalog and Handbook, Seiten E10-E18 (1991)), die mit den dominanten chemisch reaktiven Gruppen an jeder Spezies des festen Trägers wechselwirken.

10

VI. Codieren der Identifizierungs-Tag-Information

15

Die Wahl der Basen, die in einem Oligonucleotid-Identifizierungs-Tag verwendet werden, ist durch die Chemie der Oligomersynthese bestimmt. Beispielsweise würde die Verwendung einer starken Säure zur Entfernung der Schutzgruppen an den Peptiden die Nucleinsäuren depurinieren. Daher könnten, falls Standard-Chemien für die Peptidsynthese angewendet werden, die Pyrimidine C und T in einem binären Code verwendet werden. Somit wäre in einer bevorzugten Ausführungsform das Identifizierungs-Tag eine Oligopyrimidinsequenz.

20

25

In einer anderen Ausführungsform kann die Labilität der Purin-Nucleotide gegen starke Säure dadurch überwunden werden, daß Purin-Nucleosidanaloga verwendet werden, wie 7-Deaza-2'-deoxyadenosin und 7-Deaza-2'-deoxyguanosin (siehe Barr et al., Bio Techniques 4: 428-432 (1986) und Scheit, Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function, Seiten 64-65 John Wiley and Sons, New York). Die Verwendung dieser oder anderer Analoga würde die Verwendung eines quaternären oder anderen, im Gegensatz zu einem binären, Codierungsschema erlauben.

30

35

Die Wiedergewinnung der Information aus den Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags ist über eine Vielzahl von Entschlüsselungsschemata möglich, von denen zwei nachstehend beschrieben sind. In dem ersten ist die Oligomersequenz-Information mindestens teilweise in der Länge des Oligonucleotids codiert. Jedes unterschiedliche Monomer, das bei einem bestimmten Schritt in der Oligomersynthese zugegeben wurde, kann durch ein Oligonucleotid-Tag einzigartiger Länge repräsentiert sein. Das Oligonucleotid enthält inhärent Vervielfältigungsstellen, wie PCR-Priming-Sequenzen, die charakteristisch für eine bestimmte Schrittzahl in der Oligomersynthese sind. Die Bestimmung der Oligomerzusammensetzung bei einer bestimmten Position in der Sequenz beinhaltet dann die Vervielfältigung



fältigung des Tags unter Verwendung der PCR-Priming-Sequenz, die charakteristisch für den Schritt in der Synthese ist und Größentrennung der Vervielfältigungsprodukte unter Verwendung bekannter Verfahren, wie Gel- oder Kapillarelektrophorese (unter Verwendung der getaggten Oligonucleotide als Standard). Diese Ausführungsform ist insbesondere
 5 brauchbar, wenn es erwünscht ist, eine Bibliothek von Verbindungen zu machen, die einer Lead-Sequenz verwandt sind. Man muß nur während der Schritte taggen, in denen eine Stelle synthetisiert wird, die analog ist.

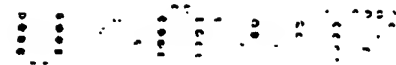
Zusätzlich zur Länge kann die Oligomersequenz-Information auch in der Sequenz der Basen
 10 codiert sein, die das Oligonucleotid-Tag umfaßt. Diese Art der Codierung ist nicht nur in der Ausführungsform wertvoll, in der man ein unterschiedliches Oligonucleotid-Tag an jeden Kupplungsschritt bindet, sondern auch in der Ausführungsform, in der man ein Oligonucleotid bei jedem Kupplungsschritt verlängert. Beispielsweise kann man, wie in Figur 4 gezeigt, Oligonucleotide mit bis zu 100 Basen (oder etwas länger) verwenden,
 15 wobei jedes sieben Regionen hat, wie nachstehend beschrieben.

Region 1 ist eine 3'-PCR-Primer-Stelle (20 bis 25 Basen). Diese Stelle wird in Verbindung mit einer weiteren PCR-Stelle (an dem 5'-Ende des Oligonucleotids) verwendet, um die Vervielfältigung mit PCR zu starten. Andere Vervielfältigungsmethoden können ebenfalls
 20 verwendet werden.

Region 2 ist eine „Schritt-spezifische“ DNA-Sequenzierungs-Primer-Stelle (15-20 Basen). Diese Stelle ist für einen bestimmten numerierten Schritt in der Syntheseriehe spezifisch. Alle Oligonucleotide, die in einem bestimmten Schritt zu allen Perlen zugegeben werden,
 25 haben diese Sequenz gemeinsam. Jeder numerierte Schritt hat eine hoch-spezifische Primer-Stelle, die diesen Schritt repräsentiert.

Region 3 ist ein Spacer (20-30 Basen). Ein Spacer-Segment mit variabler Länge, vorzugsweise jedoch 20 bis 30 Basenpaare lang, plaziert die codierende Stelle genügend weit entfernt von der Sequenzierungs-Primer-Stelle, um ein gutes „Durchlesen“ über die codierenden Monomere oder die Identifizierungsregion zu ergeben.
 30

Region 4 ist eine Monomer-Identifizierungsregion (8 Basen). Jede dieser Basen in diesem Strang repräsentiert ein Bit eines binären Codes, wobei beispielsweise T=0 und C=1. Jeder Satz an Schritt-spezifischen Identifizierungs-Tags besteht aus 8 Basen mit einer 1(C) oder einer 0(T) an jeder der 8 Positionen. Diese können als Schalter betrachtet werden, die auf „An“ oder „Aus“ bei verschiedenen Positionen gesetzt sind. Jede Monomer-Art ist durch ein Gemisch von 1 bis 8 dieser „Schalter“ codiert.
 35



Region 5 ist eine Schrittzahl-Bestätigungsregion (4 Basen plus 2 Basen an jeder Seite zur Regionunterscheidung). Vier Bits in diesem kurzen Abschnitt codieren die Schrittzahl. Dies ist redundant für den Sequenzierungs-Primer, kann jedoch verwendet werden, um zu bestätigen, daß die richtigen Primer verwendet wurden und daß der richtige Schritt decodiert wird.

Region 6 ist eine Wiederholung der Identifizierungsregion (8 Basen). Diese Region hat dieselbe Information wie Region 4 und wird verwendet, um die Monomer-Identität zu bestätigen. Das Installieren dieser zweiten Monomer-codierenden Region erhöht außerdem die Wahrscheinlichkeit, daß ein gutes Sequenz-„Lesen“ erhalten wird.

Region 7 ist eine 5'-PCR-Primer-Stelle (20 bis 25 Basen). Diese Stelle dient als eine Stelle zum Anheften eines zweiten PCR-Primers zur Vervielfältigung der Sequenz. Die Länge der Oligonucleotide mit allen sieben dieser Merkmale, wobei einige optional sind, liegt gewöhnlich zwischen 75 und 125 Basen.

Ein 8-Bit-Format kann 256 verschiedene Monomer-Arten codieren. Die Anzahl an Schritten, die codiert werden können, ist durch die Anzahl der Schritt-spezifischen Sätze (8 pro Satz) der zur Verfügung stehenden Oligonucleotide bestimmt. Mit 10 Sätzen (80 Oligos) kann man bis zu 256 verschiedene Monomere codieren, die in die Oligomere mit bis zu 10 Einheiten Länge zusammengesetzt werden (somit wird eine Codierungsfähigkeit von bis zu $256^{10} = 1,2 \times 10^{24}$ Oligomersequenzen zur Verfügung gestellt). Die codierten Identifizierungs-Tags können so verwendet werden, daß jedes Monomer einer speziellen binären Zahl zugeordnet ist (z.B. Ala=00000001, Gly=00000110, etc.). Die geeigneten Oligonucleotide werden kombiniert, um den korrekten binären Code zu ergeben.

VII. Wiedergewinnen und Decodieren der Identifizierungs-Tag-Information

Falls spezielle Perlen in einem Rezeptor-Durchmusterungsexperiment isoliert werden, können die Perlen individuell mit einer Reihe von Mitteln getrennt werden, einschließlich: infinite Verdünnung (infinite dilution), Mikromanipulation oder vorzugsweise, fluoreszenz-aktiviertes Zell-sortieren (FACS), obwohl in bezug auf die vorliegende Erfindung FACS genauer „fluoreszenzaktiviertes Oligomer oder fester Träger Sortierung“ ist (siehe Methods in Cell Biology, Vol. 33 (Darzynkiewicz, Z. und Crissman, H.A. eds., Academic Press); und Dangi und Herzenberg, J. Immunol. Methods 52: 1-14 (1982). Wenn die erwünschten Perlen isoliert worden sind, muß man das Tag identifizieren, um die Sequenz des Oligomers an der Perle sicherzustellen.

25 Eine alternative Strategie ist die Verwendung von herkömmlichen PCR-Primern und herkömmlichen Sequenzierungs-Primern (die Sequenzierungs-Primer können sogar komplett oder teilweise mit einer PCR-Primer-Stelle überlappen) und der Schritt wird durch Hybridisieren an Oligonucleotid-Sonden identifiziert, die komplementär zu jeder Schritt-spezifischen Sequenz in den Oligonucleotiden von den Perlen sind. Ein einfacher Satz von
30 Sequenzierungsreaktionen wird an allen vervielfältigten Oligonucleotiden von einer einzelnen Perle durchgeführt und die Reaktionsprodukte werden in einem einzelnen Satz von Spuren auf einem Gel laufen gelassen. Die Reaktionsprodukte werden sodann auf eine geeignete Hybridisierungsmembran transferiert und mit einer Einzelschritt-spezifischen Sonde hybridisiert; siehe Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1982). Nach der Detektion des sich ergebenden Signals wird die Sonde von
35 der Membran gewaschen und eine weitere Schritt-spezifische Sonde wird hybridisiert. Man könnte auch das in EP-PS 237,362 und der PCT-Veröffentlichung Nr. 89/11584 beschriebene Verfahren verwenden.

Parallele Hybridisierung liefert eine Alternative zu der sequenziellen Hybridisierung. Die Sequenzierungsreaktionen werden in eine Anzahl von Aliquots aufgeteilt, die der Anzahl an Peptidsyntheseschritten gleich ist und in jeweils einem getrennten Satz Spuren auf dem Sequenzierungsgel laufen gelassen. Nach dem Transferieren der Reaktionsprodukte auf eine geeignete Membran wird die Membran zerschnitten, um die Sätze an Spuren zu trennen. Jeder Spuren-Satz wird dann mit einer Vielzahl von Schritt-spezifischen Oligonucleotid-Sonden hybridisiert (siehe „Uniplex DNA sequencing“ und „Multiplex DNA sequencing“ in Plex Luminescent Kits Product Catalog, Bedford, MA, 1990).

Wie vorstehend erwähnt, kann eine einzelne Synthese an einem festen Träger (oder an einer gebundenen Perle mit einem Tag oder in Lösung in einem „Näpfchen“) nur einige 100 Kopien jedes Oligonucleotid-Tags umfassen. Diese Tags können vervielfältigt werden, z.B. mit PCR oder anderen bekannten Mitteln, um ausreichend genau zu sequenzierende DNA zu liefern. Die Fähigkeit, die Oligomere zu decodieren, hängt von der Anzahl von verfügbaren Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags, dem Grad an Vervielfältigung, der aus den verfügbaren Tags erreicht werden kann und der Genauigkeit der Sequenzierung dieser vervielfältigten DNA ab.

Die am häufigsten verwendete *in vitro*-DNA-Vervielfältigungsmethode ist PCR. Alternative Vervielfältigungsmethoden beinhalten beispielsweise Nucleinsäuresequenz-basierende Vervielfältigung (Compton, Nature 350: 91-92 (1991)) und vervielfältigte Antisense-RNA (Van Gelder et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 7652-7656 (1988)) und das selbst-erhaltende Sequenzreplikationssystem (3SR, siehe Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 (1990)).

Wenn PCR-Vervielfältigung eines Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags angewendet wird, kann „PCR-Produktverunreinigung“ auftreten, was dadurch verursacht ist, daß das Produkt einer PCR-Reaktion ein nachfolgendes PCR-Reaktionsgemisch verunreinigt, das dazu dienen soll, andere Tags mit denselben PCR-Primer-Bindungsstellen zu vervielfältigen. Man kann dieses Problem umgehen, indem Labilität in die Produktsequenzen eingeführt wird und nachfolgende Reaktionen so behandelt werden, daß potentielle Verunreinigung, die aus früheren Reaktionen hineingetragen wird, zerstört wird. Ein spezielles Beispiel dieser Strategie, für die kommerzielle Kits von PECL und Life Technologies verkauft werden, ist es, dUMP in das Produkt einzuführen. Die Behandlung jeder neuen PCR-Reaktion mit Uracil-N-glykosidase baut jede dU-enthaltende anwesende DNA ab und verhindert somit die Vervielfältigung der Verunreinigung. Die Matrizen-DNA, die kein dU enthält (nur dT)

wird nicht beeinflusst. Selbstverständlich wird die Glykosidase, bevor die Vervielfältigung begonnen wird, entfernt oder inaktiviert.

Einige der vorstehend für die Peptidsynthese beschriebenen Tags haben die ungewöhnliche
 5 Charakteristik, nur Pyrimidine zu enthalten. Das bedeutet, daß die Uracil-Glykosidase-
 Strategie (Perkin Elmer Cetus Instruments (PECI) Catalog, Alameda (1991)) nur an der
 Hälfte der hergestellten Stränge funktionieren wird - nämlich derjenigen, die T's (oder U's)
 enthalten. Man kann dUMP nicht in den komplementären nur-Purin-haltigen Strang
 10 einführen. Jedoch ist der Purinstrang sehr empfindlich gegenüber saurer Depurinierung und
 alkalisch-vermittelter Spaltung des Rückgrats. Die Kombination dieser Behandlungen kann
 die Probleme mit der Produktverunreinigung stark reduzieren. Ein anderer Ansatz, um den
 Übertrag von Verunreinigung zu verhindern, beinhaltet die Einführung einer
 Restriktionsstelle (EatI könnte für Polypyrimidin-Tags verwendet werden) in das Oligo-
 nucleotid-Tag und Spaltung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym vor der Vervielf-
 15 fältigung einer Reaktion, von der vermutet wird, daß sie mit dem Tag kontaminiert ist.
 Dieses Verfahren funktioniert nur, wenn das zu vervielfältigende Tag nicht von dem Enzym
 gespalten wird, wie es gewöhnlich bei einzelsträngigen Oligonucleotid-Tags der Fall ist.

Zum Sequenzieren der vervielfältigten DNA möchte man gewöhnlich einzelsträngige
 20 Matrizen erzeugen. Diese Erzeugung kann auf einige Arten erreicht werden. Eine dieser
 Arten ist unsymmetrische PCR, wobei ein Überschuß an einem Primer verwendet wird, um
 einen Strang bis zu einem Grad von 10- bis 100mal mehr zu vervielfältigen als den anderen
 (siehe z.B. US-PS 5,066,584). Ein weiteres Mittel, eine einzelsträngige Matrize zu liefern,
 ist es, einen der Primer zu biotinylieren und den sich ergebenden Strang zu reinigen oder mit
 25 Adsorption an immobilisiertes Streptavidin zu entfernen (Pierce Immunotechnology Catalog
 and Handbook, 1991). Noch ein anderes Mittel beinhaltet die Erzeugung von RNA-
 Transkripten (nur einen der Stränge repräsentierend) von einem RNA-Polymerase-
 Promotor und Sequenzieren der Transkripte mit reverser Transkriptase (Sommer et al.,
 Kapitel 25, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, *supra*). Wenn die
 30 Tags nur aus Pyrimidin-Nucleotiden zusammengesetzt sind, können dann alle Purinstränge
 mit Säure-/Basebehandlung eliminiert werden, wobei der Pyrimidinstrang für das
 Sequenzieren übrigbleibt.

Die Verwendung von getrennten Sequenzierungs-Primern für jedes Schritt-spezifische
 35 Oligonucleotid erfordert eine getrennte, herkömmliche Sequenzierungsreaktion für jeden
 Schritt-spezifischen Primer. Die Verwendung von Primern, die unterschiedlich markiert
 sind, würde es erlauben, die Identifizierungs-Tags von einem einzelnen festen Träger in
 einer einzelnen Reaktion zu sequenzieren und in einem einzelnen Spurensatz (2 Spuren) auf

einem Gel laufen zu lassen. Es gibt jetzt kommerziell erhältliche Primer, die mit unterscheidbaren Fluorophoren markiert sind und für diese Zweck geeignet sind (ABI Catalog). Es können auch Sätze von Chemilumineszenzmarkierungen, die heute kommerziell erhältlich sind, verwendet werden (Bronstein et al., BioTechniques 8: 310-314 (1990)).

5

Erfindungsgemäß verwendbare DNA-Sequenzierungsenzyme beinhalten Taq-DNA-Polymerase, E.coli-DNA-Polymerase I (oder Klenow-Fragment), T7-Polymerase, Sequenase™ und Sequenase II™ (modifizierte T7-DNA-Polymerasen), Bst-DNA-Polymerase und reverse Transkriptase (von AMV, MMLV, RSV, etc., siehe USB Enzymes for DNA Sequencing, U.S. Biochemical Corp., 1991, Cleveland, OH).

10

Die Sequenz eines Oligonucleotid-Tags kann auch mit Hohe-Genauigkeit-DNA-Hybridisierungstechniken identifiziert werden. In diesem Fall können immobilisierte Polymerthesen in sehr großem Maßstab mit Oligonucleotiden verwendbar sein (siehe PCT-Patentveröffentlichungen Nr. 92/10587 und 92/10588).

15

VIII. Durchmustern nach Rezeptoren mit synthetischen Oligomer-Bibliotheken

Die erfindungsgemäßen getaggten synthetischen Oligomer-Bibliotheken haben eine weite
20 Vielzahl an Verwendungen. Beispielsweise können diese Bibliotheken verwendet werden, um Peptid- und Nucleinsäuresequenzen zu bestimmen, die an Proteine binden, beim Auf-
finden von Sequenz-spezifisch bindenden Arzneimitteln, zum Identifizieren von Epitopen,
die von Antikörpern erkannt werden und zum Bewerten einer Vielzahl von Arzneimitteln
für klinische und diagnostische Anwendungen und Kombinationen des vorstehend
25 genannten. Beispielsweise könnten Peptide, die nur etwa 5 Aminosäuren lang sind, in
Rezeptor-Bindungsstudien verwendbar sein.

25

Synthetische Oligomere, die an kleinen Perlen angebracht sind, könnten auf die Fähigkeit,
an einen Rezeptor zu binden, durchmustert werden. Der Rezeptor kann mit der Bibliothek
30 aus synthetischen Oligomeren in Kontakt gebracht werden, unter Ausbildung eines gebundenen
Mitglieds zwischen einem Rezeptor und dem Oligomer, das in der Lage ist, an den
Rezeptor zu binden. Das gebundene Mitglied kann dann identifiziert werden. Als ein Bei-
spiel könnte der Rezeptor ein Immunoglobulin sein.

30

35 Verfahren zur Selektion der individuellen Perlen, die Liganden an deren Oberfläche zeigen,
sind analog zu FACS-Verfahren zum Klonen von Säugetierzellen, die Zellober-
flächenantigene oder Rezeptoren exprimieren. Daher sind Verfahren zum Selektieren und
Sortieren der Perlen dem Fachmann auf dem Gebiet des Zellensortierens offensichtlich.

35

Beispielsweise kann ein Rezeptor mit einem Fluoreszenz-Tag markiert werden und dann mit dem Gemisch aus Perlen mit gebundenen Oligomeren inkubiert werden. Nach dem Abwaschen von ungebundenen oder nicht spezifisch gebundenen Rezeptoren kann man FACS verwenden, um die Perlen zu sortieren und zu identifizieren und physikalisch individuelle Perlen mit hoher Fluoreszenz zu isolieren.

Alternativ können Affinitätsadsorptionsverfahren in Verbindung mit den erfindungsgemäßen Bibliotheken angewendet werden. Das Gemisch aus Perlen kann einer Oberfläche ausgesetzt werden, auf der ein Rezeptor immobilisiert wurde (siehe PCT-Patentveröffentlichung Nr. 91/07087). Nach dem Waschen und Entfernen der ungebundenen Perlen kann man dann auf der Oberfläche gebundene Perlen eluieren unter Verwendung von Bedingungen, die die Stärke der Oligomer/Rezeptor-Wechselwirkung mindern (niedriger pH, beispielsweise). Das Verfahren der Affinitätsadsorption kann mit den eluierten Perlen wiederholt werden, falls es erwünscht ist. Zum Schluß werden die Perlen physikalisch getrennt mit beispielsweise begrenzter Verdünnung, mit FACS oder mit Verfahren, die denjenigen ähnlich sind, in denen Zellen mit einem Rezeptor inkubiert werden, der an kleine superparamagnetische Perlen gekuppelt ist und dann werden Zellen, die einen Liganden für den Rezeptor exprimieren, unter Verwendung von Hochleistungsmagneten extrahiert (siehe Miltenyi et al., *Cytometry* 11: 231-238 (1990)). Magnetisch selektierte Zellen können dann weiter analysiert und sortiert werden unter Verwendung von FACS. Radionucleotide können auch dazu dienen, einen Rezeptor zu markieren.

Alternativ kann die vorliegende Erfindung dazu verwendet werden, Bibliotheken von löslichen getaggtten Oligomeren zu erzeugen, die in einer Vielzahl von Durchmusterungsverfahren verwenden werden können. Beispielsweise kann die Oligomer-Bibliothek an Perlen mit einem Identifizierungs-Tag synthetisiert werden, das die Oligomersequenz codiert. Die mikroskopischen Perlen werden dann in einzelne Bereiche oder Näpfchen eingebracht, die in einem Silikon oder einer anderen geeigneten Oberfläche „nanohergestellt“ wurden. Die Oligomere werden dann von den Perlen abgespalten und bleiben mit der Perle und den daran gebundenen Identifizierungs-Tag(s) in dem Bereich enthalten. In einer Ausführungsform ist die Bodenoberfläche mit einem Rezeptor überzogen. Nach der Zugabe des Bindungspuffers und eines bekannten Liganden für den Rezeptor, der Fluoreszenz-markiert ist, hat man wirksam ein Lösungsphasen-Konkurrenznachweis für neue Liganden für den Rezeptor. Die Bindung des Fluoreszenz-markierten Liganden an den Rezeptor wird mit konfokaler Abbildung der Monoschicht des immobilisierten Rezeptors bestimmt. Die Näpfchen mit erhöhter Fluoreszenz an der Rezeptoroberfläche zeigen an, daß das abgelöste Oligomer mit dem markierten Liganden konkurriert. Die Perlen oder das Tag in den Näpf-

chen, die Konkurrenz zeigen, werden wiedergewonnen und das Oligonucleotid-Tag wird vervielfältigt und sequenziert, um die Sequenz des Oligomers aufzudecken.

Die Perlen werden in die Näpfchen verbracht, indem man sie in einem Volumen eines
 5 Beladungspuffers dispergiert, das ausreichend ist, um einen Durchschnitt von einer Perle
 pro Näpfchen zu liefern. In einer Ausführungsform wird die Lösung der Perlen in ein
 Reservoir oberhalb der Näpfchen gebracht und die Perlen werden in den Näpfchen absitzen
 gelassen. Die Spaltung des Oligomers von den Perlen kann unter Verwendung von
 10 chemischen oder thermalen Systemen erreicht werden, jedoch ist ein Photo-spaltbares
 System bevorzugt.

Die Wiedergewinnung der Identifizierungs-getaggten Perlen von den positiven Näpfchen
 kann durch ein Mikromanipulator-Heraus-picken der einzelnen Perlen bewirkt werden. Ein
 bevorzugtes Verfahren beinhaltet jedoch die Verwendung von Perlen, die vorher mit einem
 15 Fluoreszenz-Tag markiert wurden. Ein Laser mit einer geeigneten Wellenlänge wird sodann
 verwendet, um die Perlen in nur den positiven Näpfchen zu bleichen. Alle Perlen werden
 dann en masse entfernt und mit FACS sortiert, um die gebleichten Positiven zu
 identifizieren. Die assoziierten Tags können dann vervielfältigt und decodiert werden.

20 In einer Variation dieses Nachweises können das Oligomer und das Tag, die an einem her-
 kömmlichen Linker hängen, synthetisiert werden, der wiederum an den festen Träger
 gebunden ist. Nach dem Verbringen der Perlen in die Näpfchen, kann man den Linker von
 der Perle spalten, wobei ein getaggttes Oligomer in Lösung hergestellt wird. Ein immobili-
 25 sierter Rezeptor, wie ein Rezeptor, der an eine Perle gebunden ist oder ein Rezeptor, der
 auf einer Oberfläche des Näpfchens immobilisiert ist, kann in einem Konkurrenznachweis
 mit dem Oligomer und einem Fluoreszenz-markierten Liganden durchmustert werden. Statt
 der Wiedergewinnung der Perlen kann man die Perlen mit den immobilisierten Rezeptoren
 wiedergewinnen und die Perlen unter Verwendung von FACS sortieren, um die Positiven zu
 30 identifizieren (abnehmende Fluoreszenz, die von der Konkurrenz des Bibliotheks-Oligomers
 mit dem markierten Liganden verursacht ist) oder man kann die Fluoreszenz bestimmen, die
 von der Näpfchenoberfläche emittiert wird, die mit dem Rezeptor beschichtet ist. Das
 assoziierte Identifizierungs-Tag kann dann vervielfältigt und decodiert werden.

35 In einer dritten Variation dieses Ansatzes werden lösliche getaggte Oligomere, die entweder
 durch Spaltung des verknüpften Oligomers und Tags von dem festen Träger wie vorstehend
 beschrieben hergestellt wurden oder mit dem VLSIPS™-Verfahren, wie vorstehend
 beschrieben, synthetisiert wurden oder in Lösung ohne einen festen Träger synthetisiert
 wurden, mit einem immobilisierten Rezeptor inkubiert werden. Nach einem Waschschrift

werden die gebundenen, getaggten Oligomere von dem Rezeptor durch z.B. Säurebehandlung freigesetzt. Die Tags an den gebundenen Oligomeren werden vervielfältigt und decodiert.

5 IX. Ein automatisiertes Instrument zur Synthese und Markierung von Oligomeren

Die Kupplungsschritte für einige Monomer-Sätze (z.B. Aminosäuren) erfordern eine lange Inkubationszeit und ein System zum parallelen Durchführen vieler monomerer Additionen ist wünschenswert. Das kann mit einem automatisierten Instrument erreicht werden, das in
10 der Lage ist, 50 bis 100 parallele Reaktionen (Kanäle) durchzuführen. Solch ein Instrument ist in der Lage, das Reaktionsgemisch oder -aufschlämmung der festen Träger für die Synthese zu verteilen, unter programmierbarer Kontrolle, auf die verschiedenen Kanäle zum Zusammenlegen, Mischen und Wiederverteilen.

15 Vier Installationen, die typisch für Peptid-Synthesizer sind, sind erforderlicher, mit einer großen Anzahl an Reservoirs für die Diversität der Monomere und die Anzahl an Tags (bis zu 80 für eine 10-Schritt-Synthese in einer Ausführungsform). Die Fähigkeit, das Tag zu verteilen, wird einfache Anweisungen in ein richtiges Gemisch aus Tags übersetzen und dieses Gemisch verteilen. Monomer-Aufbaublöcke werden auch verteilt, wie erwünscht, als
20 spezielle Gemische. Reaktionsschütteln, Temperatur- und Zeitkontrolle können zur Verfügung gestellt werden. Ein geeignet ausgelegtes Instrument kann auch als ein Multi-Kanal-Peptid-Synthesizer dienen, der in der Lage ist, 1 bis 50 mgs (roh) von bis zu 100 spezifischen Peptiden für die Zwecke des Nachweises herzustellen; siehe PCT-Patentveröffentlichung 91/17823.

25

BEISPIEL I. SYNTHESSE AN GLASPERLEN VON 4 FLUORESCENZ-GETAGGTEN PENTAPEPTIDEN

A. Derivatisierung der Glasperlen

30

Etwa 0,5 g Silikaperlen (Polyscience) mit einem Durchmesser von 3-10 µm wurden durch Refluxieren in 10%iger wäßriger HNO₃ für 20 Minuten gewaschen. Die Perlen wurden pelletiert und mit destilliertem Wasser (5x) und Methanol (3x) gewaschen und dann bei 125°C für 12 Stunden getrocknet. Die Perlen wurden mit einer 5% Lösung von Amino-
35 propyltriethoxysilan in Aceton für 10 Stunden gevortexed, pelletiert und dann mit Aceton (2x), Ethanol (5x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen und bei 125°C für 45 Minuten getrocknet. Die Perlen wurden in trockenem DMF (1 ml) mit Diisopropylethylamin (17 µl, 100 µMol) suspendiert und eine Lösung aus Fmoc-b-Alanin, Pentafluorphenylester (200

mg, 420 μ Mol, Peninsula Labs) in destilliertem Wasser (1,5 ml) wurde zugegeben. Nach einer 11stündigen Vortex-Behandlung wurden die Perlen pelletiert und mit DMF (3x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. Die Perlen wurden mit einer 10% Lösung von Essigsäureanhydrid in DMF mit 0,05 Mol 4-Dimethylaminopyridin behandelt, um jegliche
 5 unterivatisierten Aminopropylgruppen zu schützen (cap) und dann wurde mit DMF (2x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. Die Perlen wurden in einer 20% Lösung von Piperidin in DMF gevortexed und dann die Freigabe des Fmoc-Piperidin-Addukts durch Überwachen des Absorptionsspektrums des Überstands bei 302 nm ($\epsilon_{302} = 7800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) quantifiziert. Eine Schätzung des Grades an Substitution von 10 μ Mol von Aminogruppen/g
 10 Perlen wurde so erhalten. Am Ende wurden die Perlen mit Methanol (5x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen und dann bei 85°C für 12 Stunden getrocknet.

B. Herstellung von Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH

15 Glycyl-L-Phenylalanyl-L-leucin (552 mg, 1,5 mMol, Bachem) wurde in einer Lösung, die destilliertes Wasser (10 ml) und 1 M NaOH (1,5 ml) enthält, gelöst. Die Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt und wurde mit einer Lösung von Di-tert.-butylpyrocarbonat (337 mg, 1,5 mMol) in p-Dioxan (12 ml) behandelt. Ein weißes Präzipitat wurde schnell gebildet, das sich jedoch nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wieder aufgelöst hat. Die Lösung
 20 wurde in vacuo zur Trockne konzentriert, der Rest wurde in Wasser (5 ml) aufgenommen und der pH wurde auf 2,5 durch Zugabe von 1 M KHSO₄ eingestellt. Die wäßrige Suspension wurde mit EtOAc (2x, 15 ml) extrahiert, die organische Schicht abgetrennt und über MgSO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels in vacuo wurde der Rest mit Hexan verrieben. Man erhält Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH als weißen Feststoff (Ausbeute
 25 = 642 mg, 98%).

C. Herstellung von Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen

30 Boc-Gly-L-Phe-L-Leu-OH (44 mg, 0,1 mMol), Benzotriazol-1-yloxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (44 mg, 0,1 mMol) und 1-Hydroxybenzotriazolhydrat (14 mg, 0,14 mMol) wurden in trockenem DMF (1 ml) gelöst. Diisopropylethylamin (20 μ l, 0,115 mMol) wurden sodann zugesetzt und 0,65 ml dieser Lösung wurden sofort in ein Mikrozentrifugenröhrchen transferiert, das 80 mg der Amino-derivatisierten Glasperlen enthält. Das versiegelte Röhrchen wurde 3,5 Stunden gevortexed und sodann wurden die
 35 Perlen pelletiert und mit DMF (3x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. Die Schutzgruppen wurden sodann von den Perlen mit einer 50% Lösung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid für 30 Minuten entfernt, mit Methylenchlorid (2x), Ethanol (2x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen und bei 55°C für 1 Stunde getrocknet.

D. Herstellung von Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen (SEQ ID NO:10)

5 Fmoc-Glycinpentafluorophenylester (46 mg, 0,1 mMol) wurden in trockenem DMF (1 ml) gelöst, das Diisopropylethylamin (17 µl, 0,1 mMol) enthält. Etwa 0,65 ml dieser Lösung wurden zu 20 mg von Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen in einem Mikrozentrifugenröhrchen gegeben und das Röhrchen wurde 3 Stunden gevortexed. Die Perlen wurden pelletiert und mit DMF (4x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. Das Entfernen der Schutzgruppe wurde durch
10 Behandlung mit einer 20% Lösung von Piperidin in DMF für 30 Minuten bewirkt. Die Perlen wurden mit DMF (2x), Ethanol (2x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen und bei 60°C für 4 Stunden getrocknet.

E. Herstellung von L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen (SEQ ID NO:11)

15 Fmoc-L-Prolinpentafluorophenylester (50 mg, 0,1 mMol) wurden in trockenem DMF (1 ml) gelöst, das Diisopropylethylamin (17 µl, 0,1 mMol) enthält. Etwa 0,65 ml dieser Lösung wurden zu 20 mg von Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen in einem Mikrozentrifugenröhrchen zugesetzt und das Röhrchen wurde 3 Stunden gevortexed. Die Perlen wurden pelletiert und mit DMF (4x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. Das Entfernen der Schutzgruppe
20 wurde durch Behandlung mit einer 20% Lösung Piperidin in DMF für 30 Minuten bewirkt. Die Perlen wurden mit DMF (2x), Ethanol (2x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen und bei 60°C für 4 Stunden getrocknet.

F. Fluoreszin-Färben der Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen

25 Etwa 5,4 mg von Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen wurden in 450 µl wäßrigem Boratpuffer (pH 8,5) suspendiert und 54 µl einer 10µM Lösung Fluoreszinisothiocyanat (FITC) wurden zugegeben. Nach einer 1,5ständigen Vortex-Behandlung wurden die Perlen mit Puffer (5x), Ethanol (2x) und Methylenchlorid (2x) gewaschen. FACS-Analyse zeigt an, daß ca. 10%
30 der verfügbaren Aminogruppen mit FITC titriert wurden.

G. Co-Kuppeln von L-Tyrosin und Biotin zu einem Gemisch von L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu und FITC-markierten Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen

35 5 mg der FITC-markierten Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen und 5 mg L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen wurden in einem einzelnen Röhrchen gemischt, mit einer 0,1 mM Lösung von Diisopropylethylamin in Methylenchlorid gevortexed und die Suspension wurde in zwei gleichgroße Teile aufgeteilt. Die Perlen wurden pelletiert und ein Teil wurde einer Lösung

mit Fmoc-O-tert.-butyl-L-tyrosinpentafluorophenylester (59 mg, 95 µMol), N-Hydroxy-succinimidobiotin (1,7 mg, 5 µMol) und Diisopropylethylamin (17 µl, 100 µMol) in trockenem DMF (1 ml) zugesetzt. Nach Vortexen für 3 Stunden wurden die Perlen mit destilliertem Wasser (2x), Ethanol (2x), Methylenchlorid (2x) und DMF (1x) gewaschen.

5 Das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde durch Behandlung mit einer 20%-Lösung von Piperidin in DMF für 30 Minuten bewirkt und die tert.-Butyl-Seitenkettenschutzgruppen wurden durch Behandlung mit 25% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid für 30 Minuten entfernt. Die pelletierten Perlen wurden mit Methylenchlorid (2x), Ethanol (2x) und TBS (1x) gewaschen.

10 H. R-Phycoerythrin-Färben von biotinylierten L-Tyr-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen (Gemisch aus SEQ ID NO:12 und SEQ ID NO:13)

Biotinylierte L-Tyrosin-Perlen aus dem vorstehenden (G) wurden in TBS (0,5 ml) suspendiert und mit 10 µl R-Phycoerythrin-Avidinkonjugat (Molecular Probes) für 30 Minuten behandelt. Die pelletierten Perlen wurden mit TBS (5x) gewaschen.

15

I. Co-Kuppeln von L-Prolin und Biotin zu einem Gemisch von L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu und FITC-markierten Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen (Gemisch aus SEQ ID NO:15 und SEQ ID NO:14)

20

5 mg eines Gemisches aus L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu und FITC-markierten Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen wurden mit einer Lösung behandelt, die Fmoc-L-Prolinpentafluorophenylester (48 mg, 95 µMol), N-Hydroxysuccinimidobiotin (1,7 mg, 5 µMol) und Diisopropylethylamin (17 µl, 100 µMol) in trockenem DMF (1 ml) enthält. Nach 3stündiger Vortex-Behandlung wurden die Perlen mit DMF (2x), Ethanol (2x), Methylenchlorid (2x) und DMF (1x) gewaschen. Das Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde durch Behandlung mit einer 20% Lösung von Piperidin in DMF für 30 Minuten bewirkt und die Perlen wurden unter Kontrolle mit 25% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid für 30 Minuten behandelt. Die pelletierten Perlen wurden mit Methylenchlorid (2x), Ethanol (2x) und TBS (1x) gewaschen.

25

30

J. Tri-Color-Färben von biotinylierten L-Pro-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen

Biotinylierte L-Prolin-Perlen aus vorstehendem (I) wurden in TBS (0,5 ml) suspendiert und mit 20 µl Tri-Color: Streptavidin-Konjugat (Caltag-Labs) für 30 Minuten behandelt. Die pelletierten Perlen wurden mit TBS (5x) gewaschen.

35

K. Selektion der Perlen, die Peptid-Liganden für den monoklonalen Antikörper 3E7 enthalten

Der monoklonale Antikörper 3E7 wurde gegen das opioide Peptid Betaendorphin hergestellt. Die Bindungsspezifität von MAb 3E7 wurde durch Lösungsnachweise mit chemisch synthetisierten Peptiden gut charakterisiert. Die Gleichgewichtsbindungskonstanten (K_d) der hier betrachteten Peptide sind wie nachstehend: YGGFL ist 6,6 nM und YPGFL, PPGFL und PGGFL sind jeweils >1 mM. Somit zeigt nur das Peptid YGGFL merkliche Affinität für den Antikörper.

Ein Gemisch aus Perlen, die entweder YGGFL, YPGFL, PGGFL oder PPGFL und ihre jeweiligen Tags enthalten (siehe oben) wurden in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) zugegeben, die den monoklonalen Antikörper 3E7 enthält, der vorher mit kolloidalen superparamagnetischen Mikroperlen (Milenyi Biotec, Westdeutschland) konjugiert wurden. Nach einer 16stündigen Inkubation bei 4°C wurden die Perlen, die den 3E7-Antikörper gebunden hatten, selektiert, unter Verwendung eines hochstarken Magneten. Die selektierten Perlen wurden dann mit Flußcytometrie analysiert. Die Analyse der selektierten Perlen zeigte, daß sie sowohl Fluoreszin als auch R-Phycoerythrin enthalten, was andeutet, daß nur Perlen, die das Peptid YGGFL aufweisen, von dem 3E7-Antikörper selektiert werden.

BEISPIEL 2: SYNTHESE AN GLASPERLEN VON 4 PENTAPEPTIDEN, DIE MIT OLIGONUCLEOTID-IDENTIFIZIERERN GETAGGT SIND

A. Synthese von Identifizierungs-Oligonucleotiden (I)-(IV)

Die Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags (I)-(IV) haben die nachstehend gezeigten Sequenzen. Die zu den 5'- und 3'-PCR-Primern komplementären Regionen sind unterstrichen. Die zu den Schritt-spezifischen Sequenzierungs-Primern komplementären Regionen sind in Kleinbuchstaben gezeigt: es gibt zwei Schritte in diesem Beispiel. Die Monomercodierende Region ist in Fettdruck gezeigt: CT₇ codiert Gly, TCT₆ codiert L-Pro und TTCT₃ codiert L-Tyr in diesem Fall. Somit codieren die Oligos (I)-(IV) jeweils für Gly in Position 2, L-Pro in Position 2, L-Tyr in Position 1 und L-Pro in Position 1.

(I) 5'-B1B2-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTCTCTCTCTTTTCTC
 CTCTTTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCccctttctctcttct
 ctCCCTCTCCTCTCTCTCTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:1)

(II) 5'-B¹B²-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCCTCTCTTTTCTC
 CTTTCTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCccctttctctcttc
 ctCCTCTCCTCTCTCTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:2)

5 (III) 5'-B¹B²-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCCTCTTTTCTC
 CTTTCTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCctttctttccctct
 ctctctCCCTCTCCTCTCTCTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:3)

10 (IV) 5'-B¹B²-CTTTCTTCCTCTCCCTCTTTTCCTCTCTTTTCTC
 CTTTCTTTTCTCTCCCTCTCTCCTCTCTCctttctttccctct
 ctctctCCCTCTCCTCTCTCTCTTTCC-3' (SEQ ID NO:4)

wobei: B¹ = p-Maleimido-C₆H₄-(CH₂)₃-C(O)NH-(CH₂)₆-O-PO₂-O-, und B² = CH₂-
 CH[(CH₂)₄-NH-Biotin]-CH₂-O-PO₂-O-.

15 Die Oligos (I)-(IV) werden an einem ABI-PCR-verkuppelten Synthesizer (ABI PCR-mate
 synthesizer) unter Verwendung von kommerziell erhältlichen (Sigma) DMT-O-Me-Phos-
 phoramiditen synthetisiert. Die N⁴-Aminogruppe von Cytidin ist als Benzoylderivat
 geschützt. Die 5'-terminalen (B1) und die vorletzten (B2) Phosphoramidite sind jeweils N-
 20 MMT-C₆-AminoModifizier (Clonetech) und Biotin-Phosphoramidit (Glen Research) für jedes
 Oligonucleotid. Die vollständig geschützten O-Methylphosphorotriester-Oligomere werden
 von dem CPG-Träger durch Behandlung mit konzentrierter NH₄OH bei 25°C für 1 Stunde
 gespalten. Die rohen Produkte werden durch Affinitätschromatographie an einer
 monomeren Avidin-Agarosesäule (Pierce) gereinigt und das Material mit der vollen Länge
 25 wird mit 2 mM Biotin eluiert. Die 5'-MMT-Gruppe wird durch Behandlung mit 80%
 Essigsäure für 1 Stunde bei 25°C entfernt und die Lösung wird zur Trockne eingedampft.
 Die Produkte werden in PBS, pH 8,0, aufgelöst und mit einem 50fachen Überschuß an
 Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrat (Pierce) in DMF für 30 Minuten behandelt.
 30 Die modifizierten geschützten Oligonucleotide werden mit RP-HPLC entsalzt, lyophilisiert
 und unter Stickstoff gelagert.

Die für die PCR und das Sequenzieren verwendeten Primer werden in herkömmlicher Weise
 hergestellt und sind nachstehend gezeigt:

35 5' PCR Primer 5'-TCCTCTCCCTCTTTCTCCTCT-3'

(entspricht den Basen 7-28 der SEQ ID NO:1)

3' PCR Primer 5'-Biotin-GGAAAGAAGAGAGAGAGAGAGGAGAGG-3' (SEQ ID NO:5)

Schritt #1 Sequenzierungs-Primer 5'-AGAGAGGGGAAAGGAAGA-3' (SEQ ID NO:6)

Schritt #2 Sequenzierungs-Primer 5'-AGGAAAGGAGAGAAAGGG-3' (SEQ ID NO:7)

5

B. Herstellung von Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen, die das Identifizierungs-Oligo (I) tragen

10

5 mg von Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen werden für 2 Stunden mit einer Lösung behandelt, die Fmoc-Gly-OH (99,95 µMol), Fmoc-Cys(Npys)-OH (0,05 µMol, Calbiochem), Benzotriazol-1-yloxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (100 µMol), 1-Hydroxybenzotriazolhydrat (100 µMol) und Diisopropylethylamin (150 µMol) in trockenem DMF (1 ml) enthält. Die Perlen werden mit DMF (2x) und sodann mit Methanol (2x) gewaschen und sodann mit 10 mM DTT-Lösung in Methanol für 30 Minuten behandelt, um die Schutzgruppen der Cysteinreste zu entfernen. Die Perlen wurden schnell mit eiskaltem Methanol (2x) gewaschen, pelletiert und sodann für 20 Minuten mit 100 µl einer 0,1 mM Lösung von Oligo (I) in Methanol umgesetzt. Nach Waschen mit Methanol (2x) und sodann mit DMF (2x) wurden die Perlen für 20 Minuten mit 20% Piperidin in DMF behandelt, um die Schutzgruppen zu entfernen. Am Ende wurden die Perlen mit DMF (2x), Methanol (2x) und sodann mit Methylenchlorid (2x) gewaschen und bei 45°C für 1 Stunde getrocknet.

15

20

C. Herstellung von L-Pro-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen, die das Identifizierungs-Oligo (II) tragen

25

5 mg von Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen wurden wie in vorstehend (B) behandelt, wobei Fmoc-L-Pro-OH und Oligo (II) jeweils für Fmoc-Gly-OH und Oligo (I) substituiert wurden.

30

D. Herstellung von (O^tBu)-L-Tyr-(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen, die die Identifizierungs-Oligos (III und I/II) tragen

35

Perlen aus (B) und (C) wurden zusammengelegt und in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde wie in (B) behandelt, wobei Fmoc(O^tBu)-L-Tyr-OH und Oligo (III) wie geeignet substituiert wurden.

E. Herstellung von L-Pro(Gly/L-Pro)-Gly-L-Phe-L-Leu-Perlen, die die Identifizierungs-Oligos (IV und I/II) tragen

Der zweite Pool wird wie vorstehend behandelt, wobei Fmoc-L-Pro-OH und Oligo (IV) in geeigneter Weise substituiert werden.

F. Rekonstitution und Entfernen der Schutzgruppen von der Peptid-Bibliothek

Die Perlen aus (D) und (E) werden zusammengelegt und die Schutzgruppen der Phosphate, Aminosäure-Seitenketten und der exocyclischen Nucleotidaminogruppen werden wie nachstehend entfernt. Eine Stunde Behandlung mit 1:2:2-Gemisch aus Thiophenol: Triethylamin: p-Dioxan wird gefolgt vom Waschen der Perlen mit Methanol (2x) und dann Methylenchlorid (2x). Sodann werden die Perlen für 5 Minuten mit 95:5 Trifluoressigsäure: Ethandithiol behandelt. Nach dem Waschen mit Ethanol (3x) werden die Perlen bei 55°C mit 1:1 Ethylendiamin: Ethanol für 1 Stunde behandelt und dann zuerst mit Ethanol (2x) und dann mit PBS (2x) gewaschen. Diese Sammlung von Perlen bildet die Bibliothek und enthält ca. gleiche Quantitäten an 4 immobilisierten Peptiden YGGFL, YPGFL, PGGFL und PPGFL. Zusätzlich trägt jede Perle zwei unterschiedliche 113 bp-Oligonucleotidsequenzen, die die Identität sowohl der ersten und der zweiten Aminosäure des Peptids an dieser Perle codieren.

G. PCR-Vervielfältigung des Oligonucleotid-Identifizierungs-Tags

Nach einer FAC-Sortierung der Affinitäts-gereinigten Perlen in einzelne 0,5 ml Polypropylenröhrchen werden 25 µl TBS, 0,1 µg Lachssperma-DNA (als Träger) enthaltend, zusammen mit 25 µl von 2X PCR-Vervielfältigungs-Puffer (PECI) jedem Röhrchen zugegeben. Der 2X-Puffer enthält: 100 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 8,4, 20°C, 6 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 1 µM von 5'-PCR-Primer, 1 µM von 3'-PCR-Primer und 100 Einheiten/ml Taq-DNA-Polymerase.

Nach der Pufferzugabe wird die Probe mit 50 µl Mineralöl bedeckt und in einen automatisierten Thermocycler transferiert. In dem Thermocycler werden die Proben bei 95°C für 2 Minuten Hitze-denaturiert und dann werden 35 Cyclen mit 3 Schritten durchlaufen: 95°C/30 Sek., 60°C/1 Min., 72°C/1 Min., wobei den Schritten eine Inkubation bei 72°C für zusätzliche 5 Minuten folgt. Dann werden die Röhrchen abgekühlt und bei 15°C gehalten, bis sie fertig zum Weiterverarbeiten an den Streptavidin-Perlen sind. Das Gemisch wird auf 95°C erhitzt, um die Stränge zu denaturieren und der biotinylierte Purinstrang und der Überschuß an 3'-PCR-Primer werden durch Zugabe von Streptavidin-beschichteten Perlen

entfernt. Die Röhrchen werden bei $200s^{-1}$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird in den nachstehend beschriebenen Sequenzierungsreaktionen verwendet.

H. Sequenzieren der PCR-vervielfältigten Oligonucleotid-Tags

5

Die vervielfältigten Oligonucleotide von individuellen Perlen werden isoliert und in einem Paar von Reaktionen sequenziert (unter Verwendung von ddA oder ddG als Kettenabbruchmittel) mit entweder Schritt #1-spezifischen oder Schritt #2-spezifischen Sequenzierungs-Primern.

10

Um die Matrize und den Primer aneinander anzulagern, für jeden Satz an zwei Sequenzierungsspuren, wird eine einzelne Zusammenlagerungsreaktion und eine anschließende Markierungsreaktion durchgeführt, indem 8,5 µl des Sequenzierungs-Primers (Konz. = 0,25 pMol/µl), 1,5 µl Sequenase™ 5X Sequenzierungspuffer (200 mM Tris HCl, pH 7,5, 100 mM MgCl₂ und 250 mM NaCl) und 10 µl der Matrizen-DNA aus dem vorstehenden Vervielfältigungüberstand kombiniert werden. Die Proben werden 2 Minuten auf 65°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (ca. 10 Minuten).

15

Die Markierungsreaktion wird wie folgt durchgeführt. Sequenase™ (v2,0) wird 1:20 mit TE (10 mM Tris HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA) verdünnt und ein Markierungscocktail wird hergestellt, der ein 2:3,5-Verhältnis von verdünntem Enzym zu Markierungsgemisch enthält (d.h. ein 4:2:1-Gemisch aus 150 nM dGTP, 0,1 M Dithiothreitol, alpha-³⁵S-dATP, >1000 Ci/mMol). Etwa 5,5 µl des Cocktails werden mit 10 µl des angelagerten Matrizen/Primers (aus (i)) bei 25°C für 5 Minuten inkubiert.

20

25

Die Abbruchsreaktionen werden wie folgt durchgeführt. 6 µl des Markierungsreagenzgemisches werden zu 5 µl jedes Gemisches, das geeignet für die ddXTP-Abbruchsreaktion ist, zugegeben (d.h. 80 µM dGTP, 80 µM dATP, 50 mM NaCl und 8 µM ddGTP oder 8 µM ddATP). Nach dem Inkubieren bei 37°C für 5 Minuten werden etwa 8 µl der Stopplösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau und 0,05% Xylencyanol) zu jeder der Abbruchsreaktionen gegeben.

30

Das Sequenzierungsgel besteht aus 6% Gesamtacrylamid (19:1 Acrylamid/bis), 0,09 M Tris-Base, 0,09 M Borsäure, 1 mM EDTA und 7 M Harnstoff. Das Gel wird durch Zusatz von 1,9 µl 25% Ammoniumpersulfat pro ml und 0,72 µl von TEMED pro ml der vorstehenden Gellösung polymerisiert. Dem Gel wird es erlaubt, mindestens eine Stunde zu polymerisieren und wird mindestens 20 Minuten vorlaufen gelassen vor der Probenbeladung.

35

dung. Die Gelplatten werden vor und während des Laufens zwischen 40 und 50°C gehalten.

Die Reaktionen werden auf 85-95°C für 2 Minuten vor dem Beladen erhitzt und das Gel wird laufengelassen, bis der Bromphenolblau-Farbstoff den Grund des Gels erreicht. Die Sequenzen von Interesse laufen zwischen den Bromphenolblau und den Xylencyanolmarkern. Die erforderliche Information, um die Sequenzen der Monomere in den Oligomeren, die an den Ketten hängen, zu identifizieren, ist in der DNA-Sequenzinformation enthalten.

BEISPIEL 3: PARALLELE SYNTHESE DER PEPTIDE UND DER OLIGONUCLEOTID-TAGS AN CARBOXYL-PERLEN

A. Synthese von Phosphoramiditen (I)-(IV)

Die 3'-(Allyl-N,N'-diisopropyl-phosphoramidite) von 5'-DMT-Derivaten von: (1) N⁶-(Allyloxy)-carbonyl-7-deaza-2'-deoxyadenosin, (2) N⁴-(Allyloxy)-carbonyl-2'-deoxycytidin, (3) N²-(Allyloxy)-carbonyl-7-deaza-2'-deoxyguanosin und (4) Thymidin (siehe Figur 6) werden nach den Verfahren von Hayakawa et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 112: 1691-1696 (1990), hergestellt.

B. Derivatisieren der Carboxyl-Perlen mit einem Diamin-Linker

Die Herstellung eines bifunktionalen Perlenmaterials für die parallele Synthese von Peptiden und Oligonucleotiden ist in Figur 7 gezeigt. Drei 50 mg Aliquots von Polystyrol/Polydivinylbenzol/Polymethylmethacrylat/COOH-Perlen mit 4,5 µm Durchmesser (Bangs' Laboratories) wurden jeweils in getrennte Mikrozentrifugenröhrchen eingebracht und wie nachstehend behandelt. Zuerst wurden die Perlen mit 0,1 N wässriger HCl (3 ml) behandelt und dann 15 Minuten mit Vortexen gerührt. Die Perlen wurden sodann mit einer Mikrozentrifuge pelletiert, der flüssige Überstand dekantiert und das verbleibende Perlen-Pellet wurde nacheinander mit Wasser (3x 1 ml) und Dimethylformamid (DMF, 3x 1 ml) gewaschen (durch Vortexen, Pelletieren und Dekantieren: ein Verfahren, das als „Waschen“ bezeichnet wird).

Die Verbindungen 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, 38 mg, 0,10 mM), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt, 15 mg, 0,10 mM) und DMF (0,5 ml) oder Dichlormethan (0,5 ml) wurden dem Perlen-Pellet zugesetzt. Diisopropylethylamin (DIEA, 54 µl, 0,30 mM) wurden zugesetzt und die Suspension wurde 1

Minute gevortexed. Die Verbindung 4,9-Dioxa-1,12-dodecandiamin (20 µl, 0,10 mM) wurde zugesetzt und die Reaktion wurde 30 Minuten gevortexed. Die Reaktion wurden dann mit DMF (1 ml) verdünnt und die Perlen wurden pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde mit 9:1 DMF/Wasser (1 ml) behandelt und 15 Minuten gevortexed. Die Perlen wurden sodann pelletiert, der Überstand dekantiert und die Perlen mit DMF (3x 1,0 ml) gewaschen.

C. Anbringen von Peptid- und Oligonucleotid-Synthese-Linkern

100 mg Perlen wurden mit einem Gemisch aus 4-Fmoc-Aminobuttersäure (0,1 mM) und 4-p,p'-Dimethoxytrityl-(DMT)-hydroxybuttersäure (0,1 µM) in Anwesenheit von HBTU (0,1 mM), HOBt (0,1 mM) und DIEA (0,1 mM) in 9:1 CH₂Cl₂:DMF (1,0 ml) behandelt. Nach einer Vortex-Behandlung für 30 Minuten wird das Reaktionsgemisch mit DMF (1 ml) verdünnt, die Perlen pelletiert und der Überstand dekantiert. Die Perlen werden mit DMF (3x 1 ml) gewaschen. Das Kupplungsverfahren wird sodann mit frischen Reagenzien wiederholt und wie vorstehend beschrieben pelletiert und gewaschen.

D. Aufbauen einer 3'-PCR-Primer-Stelle an den Hydroxy-Linkern

Das parallele Zusammensetzen der Oligonucleotid-getaggten Peptide an den Perlen wird in Figur 8 gezeigt. Eine PCR-Primer-Stelle von 20-25 Nucleotiden wird wie nachstehend zusammengesetzt. Anmerkung: Alle Reagenzien werden wasserfrei verwendet und die Reaktion findet unter einer trockenen Argon-Atmosphäre statt. Etwa 10 mg der Perlen werden einer 8-Schritt-Reaktionssequenz unterworfen, um ein geschütztes Phosphoramidit zu kuppeln. Die Reaktionsschritte sind: (1) Die Perlen werden 0,5 Minuten mit Acetonitril (MeCN) gewaschen, (2) DMT-Gruppen werden mit 3% Trichloressigsäure in CH₂Cl₂ für 1,5 Minuten entfernt, (3) die Perlen werden mit MeCN 3 Minuten gewaschen, (4) die Perlen werden mit 0,1 M Phosphoramidit (I, II, III oder IV) in MeCN für 2 Minuten behandelt, das entweder 0,5 M (4-Nitrophenyl)-tetrazol oder 0,5 M Pyridiniumhydrochlorid und 1,0 M Imidazol enthält, (5) die Perlen werden mit MeCN 0,5 Minuten gewaschen, (6) die Perlen werden mit einem Gemisch aus Ac₂O/2,6-Lutidin/THF (1:1:8), enthaltend 5% DMAP geschützt, (7) die Perlen werden mit 1 M ^tBuOH in CH₂Cl₂ 0,8 Minuten oxidiert und (8) die Perlen werden 0,5 Minuten mit MeCN gewaschen. Die Schritte 1 bis 8 werden von ein- bis 25mal wiederholt, um eine PCR-Primer-Stelle von bis zu 25 Nucleotiden zusammenzusetzen.

E. Kuppeln der ersten Aminosäure an die Amino-Linker

Die Peptid- und Nucleotidkupplungen können abgewechselt werden, wie in Figur 8 gezeigt. Um eine Aminosäure (oder ein Peptid) zu kuppeln, wird zuerst die Fmoc-Gruppe von den
 5 Perlen durch Behandlung mit 30% Piperidin in DMF für 60 Minuten entfernt. Die Perlen werden 3mal mit DMF gewaschen. Die Perlen werden dann 30 Minuten mit einer Lösung behandelt, die die geeignete Aminosäure (0,1 M), HBTU (0,1 M), HOBt (0,1 M) und DIEA (0,1 M) in 9:1 CH₂Cl₂: DMF enthält. Die Kupplung wird dann mit frischen Reagenzien weitere 30 Minuten wiederholt und die Perlen mit DMF (3x) und dann mit MeCN (3x)
 10 gewaschen.

F. Konstruktion des ersten Oligonucleotid-„Codons“

Ein „Codon“ von etwa 3 bis 5 Nucleotiden, das die Identität der ersten Aminosäure einzigartig repräsentiert, wird dann am 5'-Ende der Oligonucleotid-Kette angebaut, unter Verwendung des 8-Schritt-Kupplungszyklus in Verfahren (D) vorstehend.
 15

G. Kuppeln der anschließenden Aminosäuren und „Codon“-Konstruktion

Die Methoden der Verfahren (E) und (F) werden dann wiederholt unter Verwendung der geeigneten Aminosäure und der Nucleotid-Aufbaublöcke, bis das gewünschte Peptid und das die Region codierende Oligonucleotid vollständig zusammengesetzt sind.
 20

H. Konstruktion einer 5'-PCR-Primer-Stelle

Der 8-Schritt-Kupplungszyklus aus Verfahren (D) wird verwendet, um eine 20-25 Nucleotid-PCR-Primer-Stelle an dem 5'-Terminus der Oligonucleotid-Ketten aufzubauen.
 25

I. Entfernen der Schutzgruppe von den Oligonucleotid- und Peptid-Ketten

Das Entfernen der Schutzgruppe von den vollständig zusammengesetzten Peptid- und Oligonucleotid-Ketten ist wie nachstehend. Die Amino-terminalen Fmoc-Gruppen werden durch Behandlung mit 30% Piperidin in DMF entfernt und sodann mit THF (3x) gewaschen. Um die allylischen Schutzgruppen zu entfernen, werden die Perlen mit einer THF-Lösung bei 50°C für 30 Minuten behandelt, die Tris-(dibenzylidenaceton)-dipalladium-chloroform-Komplex (0,02 M), Triphenylphosphin (0,2 M) und 1:1 n-Butylamin/Ameisensäure (1,2 M) enthält, und die pelletierten Perlen werden mit THF gewaschen.
 30 Die Perlen mit 0,1 M wässriger Natrium-N,N-diethyldithiocarbamat gewaschen und sodann
 35

mit Wasser, um Spuren von Palladium zu entfernen. Die Aminosäure-Schutzgruppen werden dann durch Behandlung mit 95:5 TFA/Wasser für 30 Minuten entfernt. „Scavenger“-Reagenzien, wie 1,2-Ethandithiol und Thioanisol, können auch in dieses saure Medium zum Entfernen der Schutzgruppe einverleibt werden (z.B. 2% von jedem nach Volumen). Am Ende werden die vollständig von den Schutzgruppen befreiten Perlen mit wässrigem Puffer gewaschen und sind bereit zur Wechselwirkung mit einem biologischen Rezeptor.

BEISPIEL 4: BIBLIOTHEK-HERSTELLUNG UND DURCHMUSTERUNG

In diesem Beispiel wurden zwei Populationen von Amin-derivatisierten Perlen mit Oligonucleotiden markiert, die einzigartige Basensequenzen haben, die charakteristisch für jede Perlenpopulation sind. Die mit einem 95-Basen langen Oligonucleotid (95mer) markierte Population wurde anschließend mit dem Peptid YGGFL gekuppelt. Die Population der mit einem 110 Basen langen Oligonucleotid (110mer) markierten Perlen wurde mit Phenylalanin (F) gekuppelt. Die Perlen wurden sodann in einem Verhältnis von 20F/110mer Perlen für jede YGGFL/95mer Perle gemischt und mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper 3E7 gefärbt, der das Peptid YGGFL mit hoher Affinität bindet. Individuell Fluoreszenz-gefärbte Perlen konnten dann mit FACS direkt in die PCR-Röhrchen sortiert werden. Nach PCR ergaben 5 von 6 Fluoreszenz-gefärbten Perlen ein Fragment von vervielfältigter DNA, die 95 bp lang war. PCR der verbleibenden einzelnen Perlen ergaben kleine DNA-Fragmente, die möglicherweise Primer-Dimere sind.

Die in diesem Experiment verwendeten Oligonucleotide sind die zwei Tags, die zwei PCR-Primer und ein Sequenzierungs-Primer. Dieselben PCR- und Sequenzierungs-Primer wurden für die beiden Tags verwendet. Die beiden Tags sind in ihrer Sequenz und Länge unterschiedlich. Beide Tags wurden aus den Basen 7-DeazaA, C und T zusammengesetzt.

Das 95mer-Tag hat die Sequenz:

CCA CTC ACT ACC ACT CTA CTA TAA CCA CCC CTT CCT ATT CCA AAA TTA
CAA Act tat ctc aac tac atc tCA CAC TCA CTC ATC TCT ACA TCT AC (SEQ ID NO:8)

Das 110mer-Tag hat die Sequenz:

CCA CTC ACT ACC ACT CTA CTA TAA CCC TCC CCT ATT CCA AAA TTA CAT
CCT ATT CCA AAA TTA CAA Act tat ctc aac tac atc tCA CAC TCA CTC ATC TCT
ACA TCT AC (SEQ ID NO:9)

Für jedes Ziel repräsentieren die unterstrichenen Sequenzen PCR-Primer-Bindungsstellen: der Sense-Primer ist an dem 5'-Ende und der Antisense-Primer ist an dem 3'-Ende. Für jedes Ziel repräsentiert auch die Sequenz in Kleinbuchstaben die Sequenzierungs-Primer-Bindungsstelle.

5

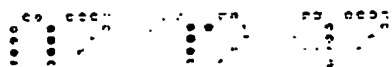
A. Perlenherstellung

Die Perlen wurden von Bang's Laboratories (979 Keystone Way, Carmel, IN 46032) gekauft und setzen sich aus carboxyliertem Polystyrol (4,5 µm Durchschnittsdurchmesser) zusammen. Diese Perlen wurden einer Diaminderivatisierung mit dem nachstehend beschriebenen Verfahren unterworfen.

Perlen (200 mg) wurden mit 1,0 ml 1 N HCl behandelt und 15 Minuten gevortexed. Die Perlen wurden pelletiert, dekantiert und 3mal (3x) mit 1,0 ml Wasser pro Waschschrift gewaschen und dann 3x mit 1,0 ml DMF pro Waschschrift gewaschen. Zu dem gewaschenen Pellet wurden 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU, 38 mg, 0,1 mM), 1-Hydroxybenzotriazolhydrat (HOBT, 15 mg, 0,1 mM), 500 µl Methylenchlorid und 54 µl Diisopropylethylamin (DIEA, 0,3 mM) zugegeben. Nach einer 2minütigen Vortex-Behandlung wurden 20 µl Diamin (4,9-Dioxa-1,12-dodecandiamin, 94 µM) zugegeben. Nach einer 30minütigen Vortex-Behandlung wurden 1,0 ml DMF zugegeben und die Perlen mit Zentrifugieren pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und 1,0 ml 10% Wasser in DMF wurden zugesetzt. Die Perlen wurden zusätzliche 15 Minuten gevortexed und schließlich 3x mit 1,0 ml DMF pro Waschschrift gewaschen.

25 B. Oligonucleotid-Anheftung

Zwei verschiedene Ziel-Oligonucleotide wurden in diesem Experiment verwendet: ein 95mer und ein 110mer. Diese Oligonucleotide setzten sich aus den Basen Cytidin, Thymidin und 7-Deaza-adenosin zusammen. Die Oligonucleotide wurden mit einer primären Aminogruppe an dem 5'-Terminus (5'-Amino-Modifier C-12, Glen Research) synthetisiert. Das lyophilisierte Oligonucleotid (600 pMol) wurde in 5 µl 0,5 M Na-Phosphat, pH 7,7, gelöst und die Lösung wurde mit 10 µl 0,2 M Disuccinimidylsuberat (DSS) behandelt. Die Reaktion wurde 10 Minuten ausgeführt und dann wurden 85 µl eiskaltes Wasser zugesetzt. Nicht-reagiertes DSS wurde durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wurde durch eine G25-Spin-Säule (G25 Spin column) geleitet, die mit Wasser equilibriert war. Das Eluat wurde sofort gefroren und lyophilisiert, um die 5'-N-Hydroxysuccinamidester des Oligonucleotids zu isolieren.



5 Dieses aktivierte Oligonucleotid wurde in 50 µl von 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, gelöst, das 0,1 mg/ml von beschallter Lachssperma-DNA enthält. Diese Lösung wurde zu 10 mg Diamin-derivatisierten Perlen gegeben. Nach 3 Stunden Vortex-Behandlung wurden die Perlen 2x mit 0,4 ml 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, jeweils gewaschen und dann 2x mit 0,4 ml 0,1 N NaOH. Am Ende wurden die Perlen 3x mit 0,4 ml von pH 7,5-Puffer gewaschen.

C. Peptid-Anknüpfung

10 Zu Boc-YGGFL oder Boc-Phe (Boc = tert.-Butoxy-carbonylamin-Schutzgruppe, 0,1 mMol) wurde HBTU (0,1 mM), HOBT (0,1 mM), 1,0 ml 10% DMF in Methylenchlorid und DIEA (0,3 mM) zugegeben. Nach der Vortex-Behandlung zur Auflösung der Feststoffe wurden 0,4 ml der Peptidlösung zu 3 mg der Oligonucleotid-markierten Perlen gegeben. Die Boc-YGGFL-enhaltende Lösung wurde zu den 95mer markierten Perlen gegeben und die Boc-Phe-enhaltende Lösung wurde zu 110mer markierten Perlen gegeben. Die
15 Reaktionsgemische wurden 30 Minuten gevortexed und dann mit DMF verdünnt, zentrifugiert, dekantiert und die Perlen-Pellets wurden 3x mit 1,0 ml THF gewaschen. Die Boc-Schutzgruppen wurden durch Behandlung der Perlen mit 0,4 ml 95% Trifluoressigsäure für 10 Minuten entfernt. Die Reaktion zum Entfernen der Schutzgruppe wurde dann mit THF verdünnt, zentrifugiert und dekantiert und die Perlen wurden 3x mit
20 1,0 ml DMF jeweils gewaschen. Am Ende wurden die Perlen 3x mit 0,5 ml 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, jeweils gewaschen und in einer Aufschlammung (10 mg/ml) gelagert.

D. Mischen, Färben und Sortieren

25 Die mit dem 95mer und YGGFL gekuppelten Perlen wurden mit den Perlen in einem Verhältnis von 1:20 gemischt, die mit dem 110mer und F gekuppelt wurden. Somit wurden 0,1 mg von 95mer/YGGFL-Perlen (2 Mio. Perlen) mit 2,0 mg der 110mer/Phe-Perlen (40 Mio. Perlen) gemischt. Das Gemisch wurde in einem Blockierungspuffer (PBS, 1% BSA und 0,05% Tween-20) suspendiert und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Die Perlen
30 wurden als nächstes durch Zentrifugieren pelletiert und in einer Lösung eines FITC-markierten monoklonalen Antikörpers 3E7 resuspendiert, der das Peptid YGGFL (1 µg/ml) bindet. Die Suspension wurde 0,5 Stunden auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert, um das Perlen-Pellet zu isolieren.

35 Die Perlen wurden in PBS zum Einbringen in das Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungs-(FACS)-instrument (Becton Dickinson FACSORT Plus) resuspendiert. Die Perlen, die an den Fluoreszenz-markierten Antikörper gebunden hatten, wurden durch deren angenommene Fluoreszenz identifiziert und die Fluoreszenz-Perlen wurden durch Sortieren in

PCR-Gefäße isoliert. Eine, 10 oder 100 Fluoreszenz-Perlen wurden in jedes PCR-Gefäße sortiert. In einer analogen Art wurden die Nicht-Fluoreszenz-Perlen in PCR-Gefäße sortiert.

E. Vervielfältigung der sortierten Perlen

5

Zu jedem eine Perle oder Perlen-enthaltenden PCR-Gefäß wurden 25 µl von PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,7, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,14 mg/ml BSA, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 200 µM dTTP, 2 µM Primer #1, 2 µM Primer #2 und 0,5 Einheiten von Pfu-DNA-Polymerase) zugegeben. Die Reaktionen wurden 40 Cyclen von 95°C für 0,5 Minuten, 55°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute unterworfen.

10

Der Gelbeladungsfärbstoff (2 µl) wurde zu 10 µl jeder PCR-Reaktion gegeben und die Probe wurde auf einem 2% Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt laufengelassen. Die DNA-Fragmente wurden durch Färben mit Ethidiumbromid und UV-Licht-Aussetzen sichtbar gemacht. 5 von 6 der Gefäße mit Einzelfluoreszenz-Perlen ergaben DNA-Fragmente mit 95 Basenpaaren Länge, was bestätigt, daß diese Perlen mit YGGFL und nicht mit F gekuppelt waren. Gefäße mit 10 oder 100 Fluoreszenz-Perlen ergaben auch 95mer DNA-Fragmente. Im Gegensatz dazu ergab keines der Gefäße mit 1, 10 oder 100 Nicht-Fluoreszenz-Perlen 95mer-Fragmente.

15

20

Es gab jedoch anomale Vervielfältigungsprodukte, die kleiner als 110 bp waren aus der Vervielfältigung der Tags der Nicht-Fluoreszenz-Perlen. Diese anomalen Produkte können durch die Verwendung der ungeschützten Oligonucleotid-Tags in diesem Beispiel entstanden sein, was es möglicherweise ermöglicht hat, daß freie exocyclische Amino zu der F-Aminosäure gekuppelt haben, wobei das Tag damit Gegenstand anomaler Vervielfältigung wurde. Dieses Problem hätte das 95mer Tag nicht in dem gleichen Maße beeinflusst, da YGGFL weniger reaktiv mit den exocyclischen Aminen ist, als F.

25

30

BEISPIEL 5: SYNTHESE DER BIBLIOTHEK UND DURCHMUSTERN

35

Dieses Beispiel ist schematisch in Figur 9 dargestellt. Kurz gesagt wurde eine Einzelpopulation von Amin-derivatisierten Perlen (wie in Beispiel 4 beschrieben hergestellt) mit Glycin gekuppelt. Die Population wurde dann in zwei gleiche Teile aufgeteilt und jeder Teil wurde mit einem charakteristischen Oligonucleotid markiert, das einzigartig die Perlen-Subpopulation identifiziert. Die Subpopulation, die mit einem Oligonucleotid mit 95 Basen Länge (das 95mer, wie in Beispiel 4 beschrieben) markiert wurde, wurde anschließend mit dem Peptid YGGFL gekuppelt. Die Population der Perlen, die mit einem Oligonucleotid mit

110 Basen Länge (das 110mer, wie in Beispiel 4 beschrieben) markiert wurde, wurde mit dem Peptid FLFLF gekuppelt (SEQ ID NO:16). Die Perlen wurden dann in einem Verhältnis von 20 FLFLF/110mer Perlen für jedes YGGFL/95mer Perlen (d.h. 20:1) gemischt und mit einem Fluoreszenz-markierten Antikörper (3E7) gefärbt, der die Peptidsequenz YGGFL mit hoher Affinität bindet. Individuelle Fluoreszenz-gefärbte Perlen und ungefärbte Perlen wurden direkt in PCR-Gefäße sortiert. Nach PCR ergaben alle Fluoreszenz-gefärbten Perlen ein Fragment von vervielfältigter DNA 95 Basenpaare lang und alle nicht-gefärbten Perlen ergaben ein Fragment 110 Basenpaare lang.

10 A. Peptid-Kupplungsschritt #1

Zu Fmoc-Gly (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonylamin-Schutzgruppe, 0,1 mM) wurden HBTU (0,1 mM), HOBt (0,1 mM), 1,0 ml von 10% DMF in Methylenchlorid und DIEA (0,3 mM) zugegeben. Nach einer Vortex-Behandlung zur Lösung der Feststoffe, wurden 0,4 ml der aktivierte Aminosäure enthaltenden Lösung zu 50 mg der Diamin-derivatisierten Perlen gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten gevortexed und dann mit DMF verdünnt, zentrifugiert, dekantiert und das Perlen-Pellet wurde 2mal mit 1,0 ml DMF gewaschen. Die Kupplungsreaktion wurde dann wiederholt. Die Perlen wurden dann mit 1,0 ml 30% Piperidin in DMF mit Vortexen für 1 Stunde behandelt, um die Schutzgruppe der Glycinaminogruppe zu entfernen.

B. Oligonucleotid-Markierung

Zwei verschiedene Ziel-Oligonucleotide wurden in diesem Experiment verwendet: das 95mer und 110mer, wie in Beispiel 4 beschrieben. Die Hälfte der Perlenprobe, wie vorstehend beschrieben (25 mg) wurde mit dem 95mer und die andere Hälfte mit dem 110mer markiert. Diese Oligonucleotide setzen sich aus 2'-Deoxycytidin, Thymidin und 2'-Deoxy-7-deaza-adenosin zusammen. Die Oligonucleotide wurden mit einer primären Aminogruppe an dem 5'-Terminus (MMT-C12-Aminomodifizier, Clontech Laboratories, Inc.) synthetisiert. Das lyophilisierte Oligonucleotid (1,5 nMol) wurde in 10 µl 0,5 M Na-Phosphat, pH 7,7, gelöst und die Lösung wurde mit 20 µl 0,2 M Disuccinimidylsuberat (DSS) behandelt. Die Reaktion wurde 10 Minuten fortgeführt und dann wurden 70 µl eiskaltes Wasser zugegeben. Unreagiertes DSS wurde durch Zentrifugieren entfernt. Der Überstand wurde durch eine G-25 Spin-Säule geleitet, die mit Wasser equilibriert wurde. Das Eluat wurde sofort gefroren und lyophilisiert, um 5'-N-Hydroxysuccinamidester des Oligonucleotids zu isolieren. Dieses aktivierte Oligonucleotid wurde in 100 µl 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, gelöst, das 0,1 mg/ml von beschalteter Lachssperma-DNA enthielt. Diese Lösung wurde zu 25 mg Glycin-gekuppelten Perlen gegeben. Nach Vortex-Behandlung für

3 Stunden wurden die Perlen 2mal mit 0,4 ml 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, und 2mal mit 0,4 ml 0,1 N NaOH gewaschen. Am Ende wurden die Perlen 3mal mit 0,4 ml pH 7,5-Puffer gewaschen.

5 C. Peptid-Kupplungsschritt #2

Zu Boc-YGGFL oder Boc-FLFLF (Boc = tert.-Butoxy-carbonylamin-Schutzgruppe, 0,02 mM) wurden HBTU (0,02 mM), HOBt (0,02 mM), 0,190 ml 10% DMF in Methylenchlorid und DIEA (0,06 mM) zugegeben. Nach Vortex-Behandlung zum Lösen der Feststoffe wurde die Lösung 10fach in 10% DMF in Methylenchlorid verdünnt. Ein Aliquot dieser Lösung (0,345 ml) wurde zu den Glycin-gekuppelten und Oligonucleotid-markierten Perlen (25 mg) gegeben. Die Boc-YGGFL-enthaltende Lösung wurde zu den mit dem 95mer markierten Perlen gegeben und die Boc-FLFLF-enthaltende Lösung wurde zu den mit dem 110mer markierten Perlen gegeben. Die Reaktionsgemische wurden 30 Minuten gevortexed und dann mit DMF verdünnt, zentrifugiert, dekantiert und die Perlen-Pellets wurden 3mal mit 1,0 ml THF gewaschen. Die Boc-Schutzgruppen wurden durch Behandlung der Perlen mit 0,4 ml 95% Trifluoressigsäure für 10 Minuten entfernt. Die Reaktion zum Entfernen der Schutzgruppe wurde dann mit THF verdünnt, zentrifugiert, dekantiert und die Perlen wurden 3mal mit 1,0 ml DMF gewaschen. Am Ende wurden die Perlen 3mal mit 0,5 ml 0,1 M Na-Phosphat, pH 7,5, gewaschen und als eine Aufschlämmung (10 mg/ml) gelagert.

D. Mischen, Färben und Sortieren

Die mit dem 110mer und FLFLF gekuppelten Perlen wurden mit den Perlen in einem Verhältnis von 20:1 gemischt, die mit dem 95mer und YGGFL gekuppelt wurden. Somit wurden 0,1 mg von 95mer/YGGFL-Perlen (2 Mio. Perlen) mit 2,0 mg von 110mer/FLFLF-Perlen (40 Mio. Perlen) gemischt. Das Gemisch wurde in einem Blockierungspuffer (PBS, 1% BSA, 0,05% Tween-20) suspendiert und bei Raumtemperatur 1 Stunde inkubiert. Die Perlen wurden sodann durch Zentrifugieren pelletiert und in einer Lösung von FITC-markiertem monoklonalen Antikörper (3E7) resuspendiert, der die Peptidsequenz YGGFL (1 µg/ml) erkennt. Die Suspension wurde 0,5 Stunden auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert, um das Perlen-Pellet zu isolieren.

Die Perlen wurden in PBS zum Einbringen in das Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungs-(FACS)-Instrument (Becton Dickinson FACSort Plus) resuspendiert. Die Perlen, die an den Fluoreszenz-markierten Antikörper gebunden hatten, wurden durch deren angenommene Fluoreszenz identifiziert (siehe Figur 10) und homogene Proben entweder der

Fluoreszenz- oder Nicht-Fluoreszenz-Perlen wurden durch Sortieren in PCR-Gefäße isoliert. 1, 10 oder 100 Perlen jeder Art wurden in jedes PCR-Gefäß sortiert.

E. PCR-sortierte Perlen

5

Zu jedem eine Perle oder Perlen enthaltenden PCR-Gefäß wurden 25 µl PCR-Gemisch (20 mM Tris-HCl, pH 8,7, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , 0,1% Triton X-100, 0,14 mg/ml BSA, 200 µM dATP, 200 µM dGTP, 200 µM dCTP, 200 µM dTTP, 2 µM jedes Primers (wie in Beispiel 4 beschrieben) und 0,5 Einheiten Pfu-DNA-Polymerase) zugegeben. Die Reaktionen wurden 40 Cyclen von 95°C für 0,5 Minuten, 55°C für 1 Minute und 72°C für 1 Minute unterworfen. Der Gelbeladungsfarbstoff (2 µl) wurde zu 10 µl jeder PCR-Reaktion gegeben und die Probe wurde in einem 2% Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt laufengelassen. Die DNA-Fragmente wurden durch Färben mit Ethidiumbromid und UV-Licht-Aussetzen sichtbar gemacht. 6 Einzelperlenproben, drei 10 Perlenproben und drei 100 Perlenproben wurden sowohl von der Fluoreszenz-Population als auch der Nicht-Fluoreszenz-Population vervielfältigt. Alle Perlenproben aus der Fluoreszenz-Population produzierten nur DNA-Fragmente mit 95 Basenpaaren Länge und alle Proben aus der Nicht-Fluoreszenz-Population produzierten nur Fragmente mit 110 Basenpaaren Länge (siehe Figur 11).

20

SEQUENZPROTOKOLL

5 (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- 10 (i) ANMELDER: Dower, William J
Barrett, Ronald W
Gallop, Mark A
Needels, Michael C
- 15 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Synthese der ver-
schiedenen Sammlungen von Oli-
gomeren
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 16
- 20 (iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:
(A) ADRESSAT: Townsend and Townsend
(B) STRASSE: 1 Market Plaza, Steuart Tower, Suite 2000
(C) STADT: San Francisco
(D) BUNDESLAND: California
(E) LAND: U.S.A.
(F) POSTLEITZAHL: 94105
- 25 (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) SOFTWARE: PatentIN Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG:
35 (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) VERTRETER:
(A) NAME: Smith, William M.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 30,223
40 (C) REFERENZNUMMER: 11509-36-1
- (ix) TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFONNUMMER: 415-543-9600
(B) TELEFAXNUMMER: 415-543-5043
45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 111 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

CTTTCTTCCT CTCCTCTTT TCTCCTCTCT TTTTCTCTCC TTCTTTTTTT CTCTCCCTCT 60
 CTCCTCTCTC CCCTTTCTCT CTTTCTCTCC TCTCCTCTCT CTCTTCTTTC C 111

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 111 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

CTTTCTTCCT CTCCTCTTT TCTCCTCTTC TTTTCTCTCC TTCTTTTTTT CTCTCCCTCT 60
 CTCCTCTCTC CCCTTTCTCT CTTTCTCTCC TCTCCTCTCT CTCTTCTTTC C 111

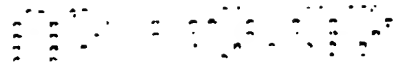
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 115 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

CTTTCTTCCT CTCCTCTTT TCTCCTCTTT CTTTCTCTCC TTCTTTTTTT CTCTCCCTCT 60
 CTCCTCTCTC TCTTCTTTTC CCCTCTCTCT CTCCTCTCTT CTCTCTCTTC TTTC 115



5 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 115 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

15

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

CTTCTTCCT CTCCTCTTT TCTCTCTTC TTTTCTCTCC TTCTTTTTT CTCTCCCTCT 60
 CTCTCTCTC TCTTCCTTC CCTCTCTCT CTCCTCTCCT CTCTCTCTC TTTCC 115

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

25

- (ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

30

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

35 GGAAAGAAGA GAGAGAGGAG AGG

23

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 (B) ART: Nucleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang

45

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

AGAGAGGGGA AAGGAAGA

18

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

AGGAAAGGAG AGAAAGGG

18

25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

30

(A) LÄNGE: 95 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

35

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

CCACTCACTA CCACTCTACT ATAACCACCC CTCCTATTTC CAAAATTACA AACTTATCTC 60

40

AACTACATCT CACACTCACT CATCTCTACA TCTAC

95

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 110 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

CCACTCACTA CCACTCTACT ATAACCCTCC CCTATTCCAA AATTACATCC TATTCCAAAA 60
10 TTACAAACTT ATCTCAACTA CATCTCACAC TCACTCATCT CTACATCTAC 110

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

15

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

25

Gly Gly Phe Leu
1

30

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

- 40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

45 (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

Pro Gly Phe Leu

1

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

10

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

Tyr Gly Gly Phe Leu

1

5

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

25

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

Tyr Pro Gly Phe Leu

1

5

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

45

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

5 Pro Gly Gly Phe Leu
1 5

10 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
15 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

Pro Pro Gly Phe Leu
1 5

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

40 (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

45 Phe Leu Phe Leu Phe
1 5

EP 92 920 422.0-1219
AFFYMAX TECHNOLOGIES N.V.
U.Z.: 29-82

PATENTANSPRÜCHE

1. Die Verwendung von Identifizierungs-Tags, um eine nachfolgende Identifizierung von Reaktionen zu ermöglichen, durch die Mitglieder einer Bibliothek von verschiedenen synthetischen Verbindungen in einer Baustein-bei-Baustein-Art synthetisiert worden sind, und darauf folgende deduktive strukturelle Identifizierung der Mitglieder.
2. Eine Bibliothek von verschiedenen synthetischen Verbindungen, wobei die Verbindungen erhältlich sind durch Synthese in einer Baustein-bei-Baustein-Art, die jede Verbindung zu einem oder mehreren Identifizierungs-Tags verknüpft, die die nachfolgende Identifizierung von Reaktionen ermöglicht, durch die die Verbindungen eingegliedert wurden, und darauf folgende deduktive strukturelle Identifizierung der Mitglieder.
3. Bibliothek nach Anspruch 2, umfassend eine Vielzahl von verschiedenen Mitgliedern, wobei jedes Mitglied ein Oligomer umfaßt, zusammengesetzt aus einer Sequenz von Monomeren verbunden mit einem oder mehreren Identifizierungs-Tags, die die Sequenz der Monomere in dem Oligomer identifizieren.
4. Bibliothek nach Anspruch 3, worin die Bindung zwischen dem Oligomer und dem Identifizierungs-Tag einen festen Träger umfaßt.
5. Bibliothek nach Anspruch 3 oder 4, worin das Identifizierungs-Tag an dem Oligomer angeheftet ist.
6. Bibliothek nach einem der Ansprüche 3 bis 5, die etwa 10^6 verschiedene Mitglieder hat.
7. Bibliothek nach einem der Ansprüche 3 bis 6, worin das Oligomer ein Peptid oder ein Oligonucleotid ist.

8. Bibliothek nach einem der Ansprüche 3 bis 7, worin das Identifizierungs-Tag ein Fluoreszenzmarker ist.

9. Eine synthetische Oligomer-Bibliothek mit Markierung, hergestellt durch Synthetisieren auf jeder von einer Vielzahl von festen Trägern eine einzelne Oligomersequenz und/oder mehrere Identifizierungs-Tags, die die Oligomersequenz identifizieren, wobei die Oligomersequenz und die Identifizierungs-Tags synthetisiert werden in einem Verfahren, umfassend die folgenden Schritte:

- (a) Verteilung der Träger unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen,
- (b) Aussetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß einem ersten Oligomer-Monomer und einem ersten Identifizierungs-Tag,
- (c) Zusammenlegen der Träger,
- (d) Verteilung der Träger unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen,
- (e) Aussetzen der Träger einem zweiten Oligomer-Monomer und einem zweiten Identifizierungs-Tag-Monomer, und
- (f) Wiederholung der Schritte (a) bis (e) mindestens ein- bis zwanzigmal.

10. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Oligomer-Bibliothek mit Markierung, umfassend eine Vielzahl von verschiedenen Mitgliedern, wobei jedes Mitglied einen festen Träger umfaßt, an den eine einzelne Oligomersequenz angeheftet ist und eine oder mehrere Identifizierungs-Tags, die die Oligomersequenz identifizieren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Verteilung der Träger unter einer Vielzahl von Reaktionsgefäßen,
- (b) Umsetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß mit einem ersten Oligomer-Monomer,
- (c) Umsetzen der Träger in jedem Reaktionsgefäß mit einem ersten Identifizierungs-Tag,
- (d) Zusammenlegen der Träger,
- (e) Verteilung der zusammengelegten Träger auf eine Vielzahl von Reaktionsgefäßen,
- (f) Umsetzen der zusammengelegten Träger in jedem Reaktionsgefäß mit einem zweiten Oligomer-Monomer,
- (g) Umsetzen der zusammengelegten Träger in jedem Reaktionsgefäß mit einem zweiten Identifizierungs-Tag, und

(h) Wiederholen der Schritte (a) bis (g) mindestens ein- bis zwanzigmal.

11. Ein fester Träger, umfassend ein erstes Teilchen, angeheftet an ein zweites Teilchen, wobei das erste Teilchen an ein Oligomer und das zweite Teilchen an einen Oligonucleotid-Identifizierungs-Tag gebunden ist und worin das Oligomer ein anderes ist als ein Oligonucleotid.

12. Verfahren zum Aufzeichnen jedes Schritts in einer Sequenz von Oligomer-Monomer-Additionen in der Synthese einer Oligomer-Bibliothek, wobei das Verfahren umfaßt das Hinzufügen eines Identifizierungs-Tags in Verbindung mit dem Hinzufügen jedes Monomers und Durchführung von mindestens zwei Zyklen der Monomer- und Tag-Addition unter Bildung einer Serie von Identifizierungs-Tags, die die Oligomersequenz identifizieren.

13. Verfahren nach Anspruch 12, worin nach dem Hinzufügen eines ersten Identifizierungs-Tags nachfolgend Identifizierungs-Tags an dem Ende des zuvor existierenden Tags angeheftet werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13 und zur Synthetisierung eines Peptids und eines Oligonucleotids auf einem festen Träger, wobei das Verfahren umfaßt:

(a) Herstellung eines bifunktionalen festen Trägers, enthaltend einen ersten Typ einer aktiven Seite, blockiert mit einem ersten Typ einer Schutzgruppe und einen zweiten Typ einer aktiven Seite, blockiert mit einem zweiten Typ einer Schutzgruppe,

(b) Umsetzen des festen Trägers mit einem Aktivator, um den ersten Typ der Schutzgruppe zu entfernen und dadurch Exponieren des ersten Typs der aktiven Seite,

(c) Kupplung eines Oligonucleotid-Monomers oder eines Oligonucleotids an den ersten Typ einer aktiven Seite,

(d) Umsetzen des festen Trägers mit einem Aktivator, um den zweiten Typ der Schutzgruppe zu entfernen und dadurch Exponieren zweiten Typs der aktiven Seite,

(e) Kupplung eines Peptid-Monomers oder eines Peptids an den zweiten Typ der aktiven Seite, und

(f) Wiederholung der Schritte (b) bis (e) ein- bis zwanzigmal.

15. Eine Oligomer-Bibliothek, erhältlich durch ein Verfahren umfassend ein Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14.

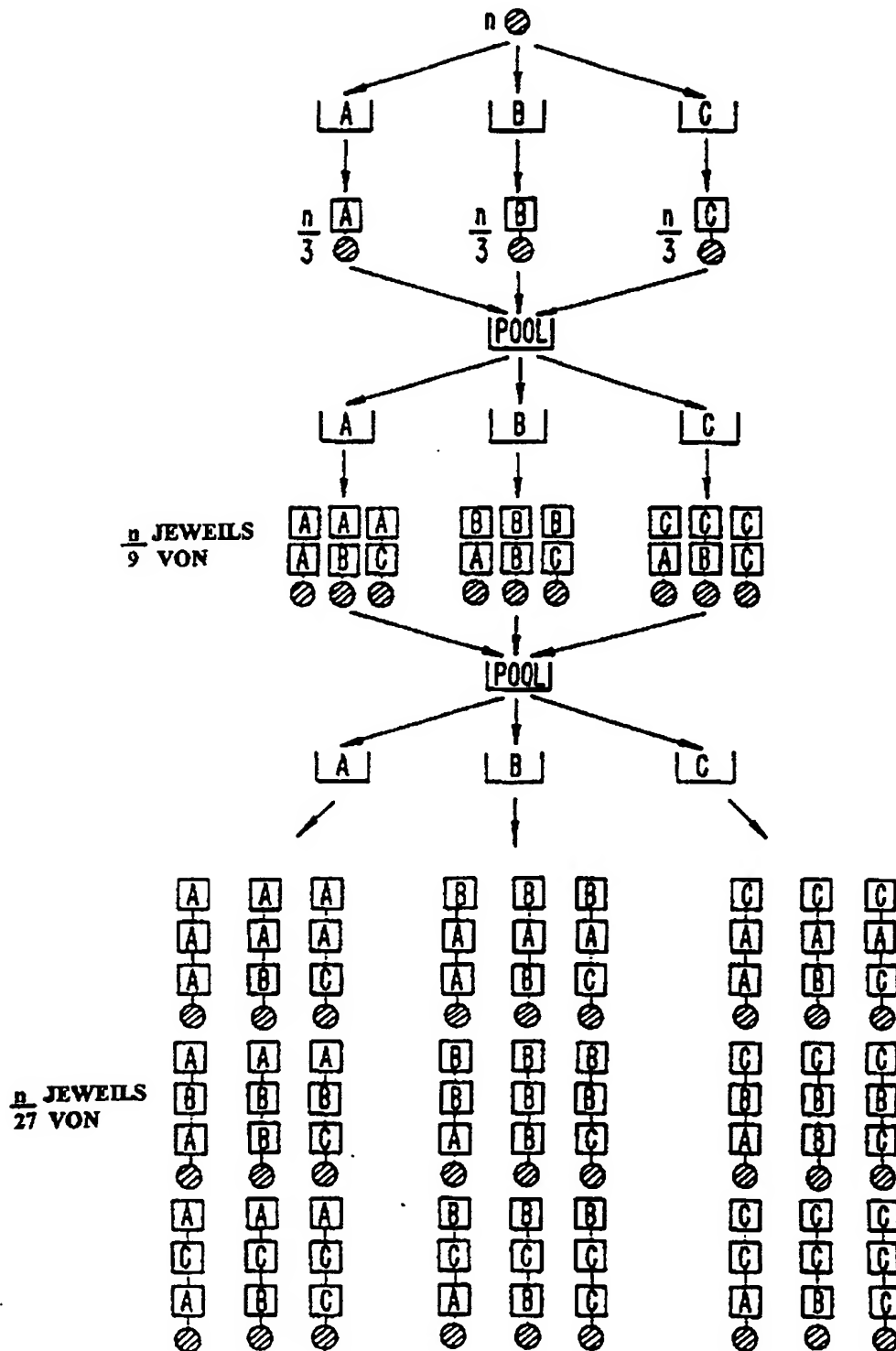


FIG. 1.

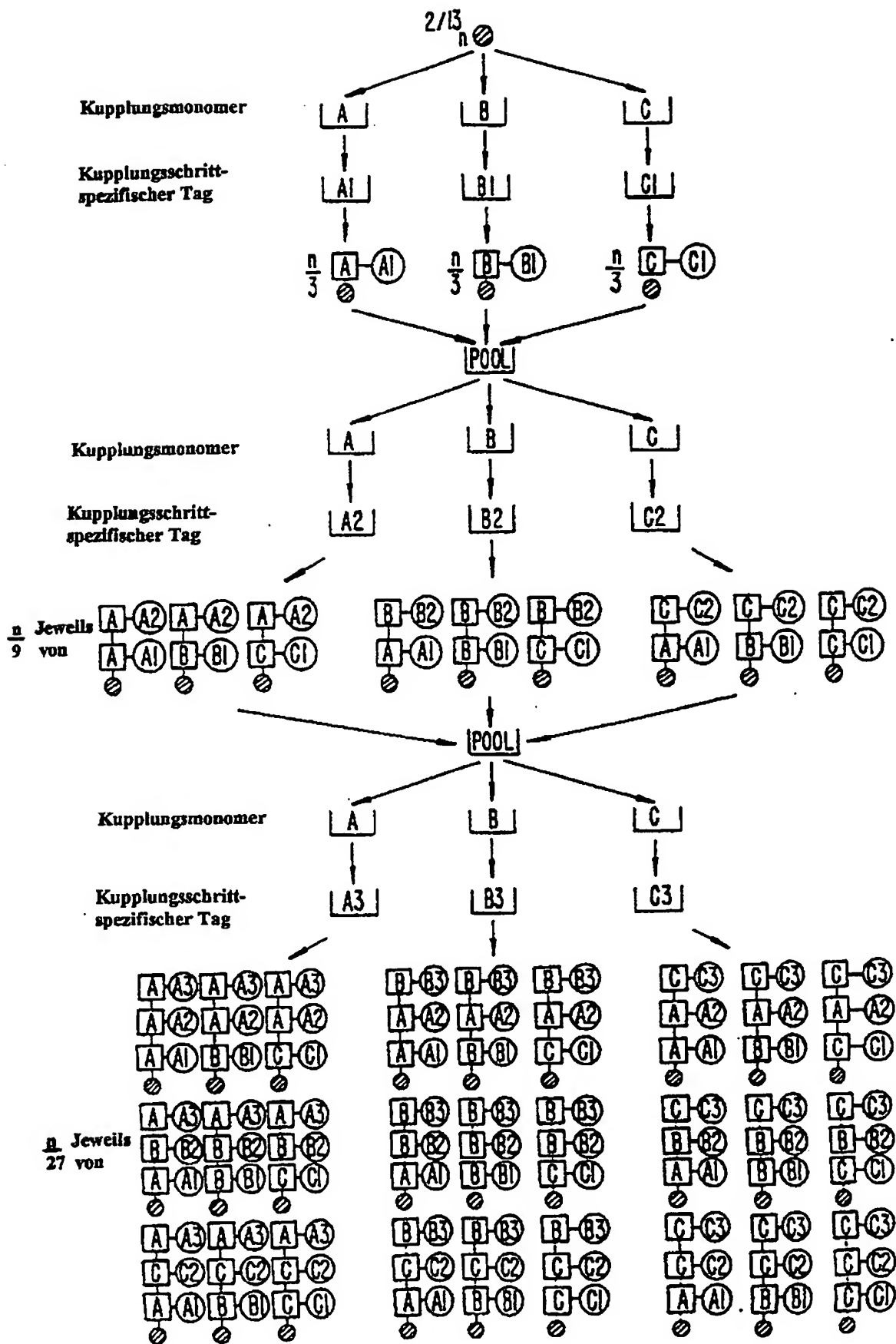


FIG. 2.

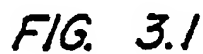


FIG. 3.2

4/13

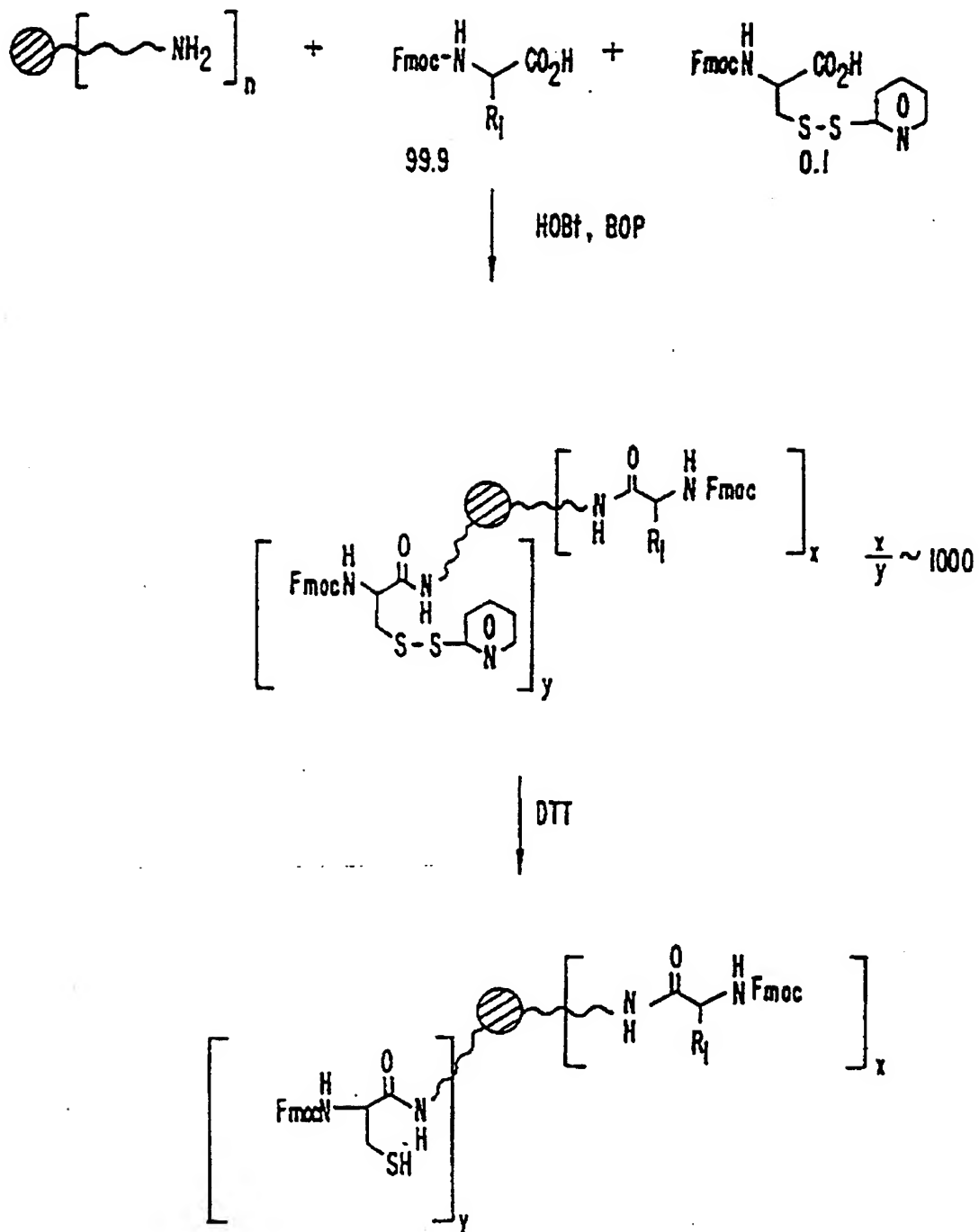
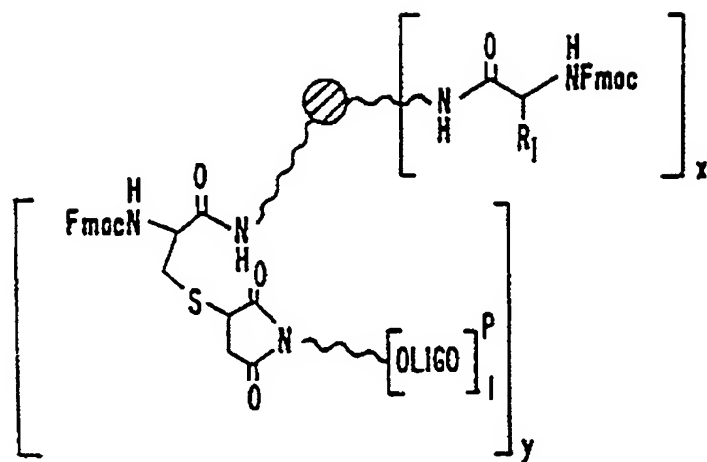
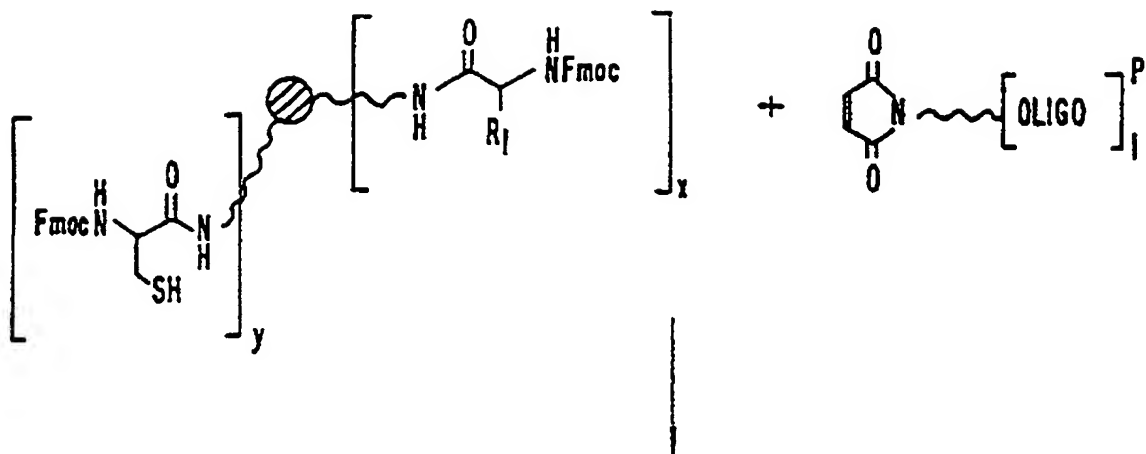


FIG. 3.3

5/13



III

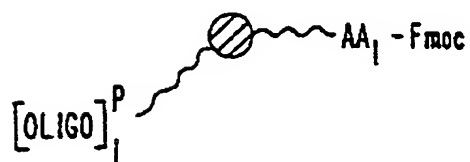
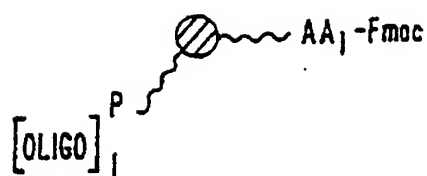


FIG. 3.4

6/13



(i) PIPERIDIN

(ii) Fmoc-AA₂-OH (99.9)

Fmoc-Cys(Npg5)-OH (0.1)

HOBt, BOP

(iii) DTT

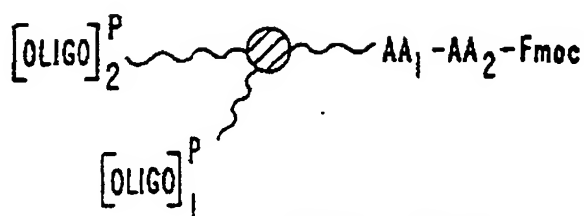
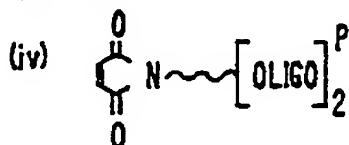
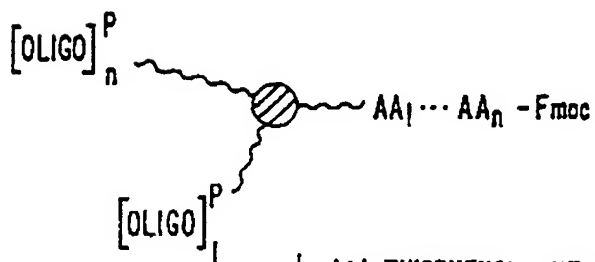


FIG. 3.5



(i) THIOPHENOL, NEt₃, DIOXAN

(ii) TFA, CH₂Cl₂

(iii) ETHYLENEDIAMIN., ETHANOL, Δ

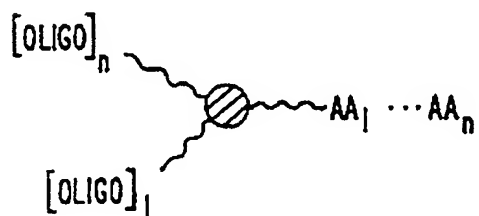


FIG. 3.6

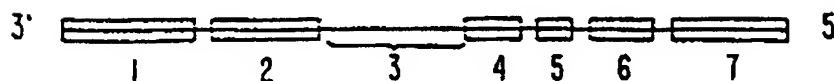


FIG. 4.



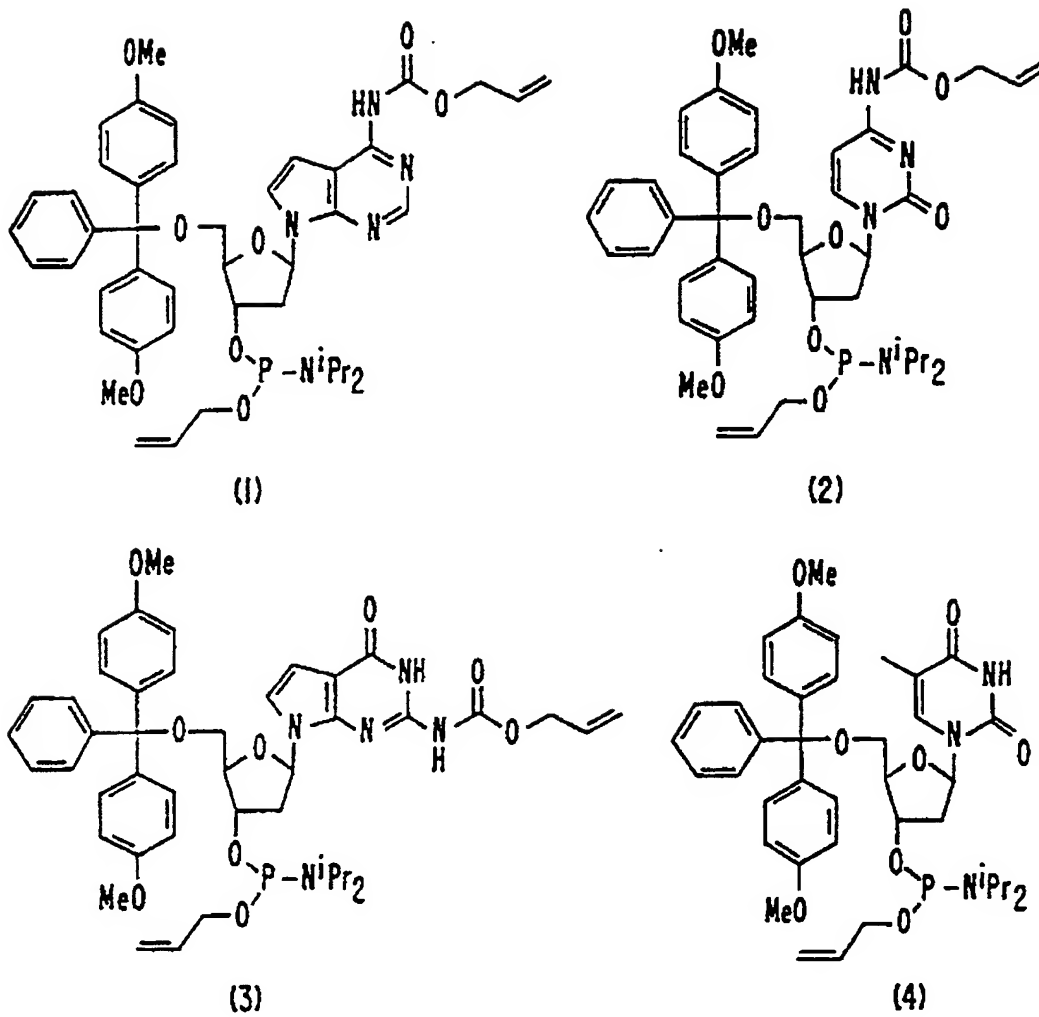


FIG. 6.

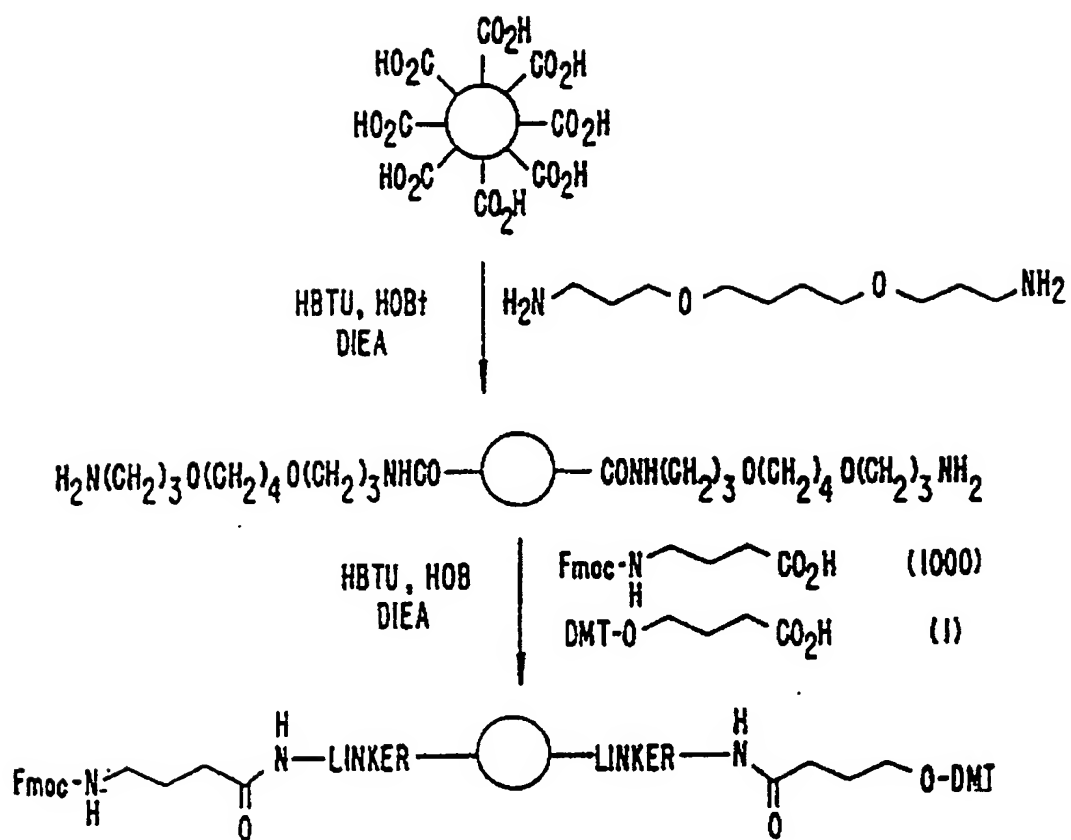


FIG. 7.

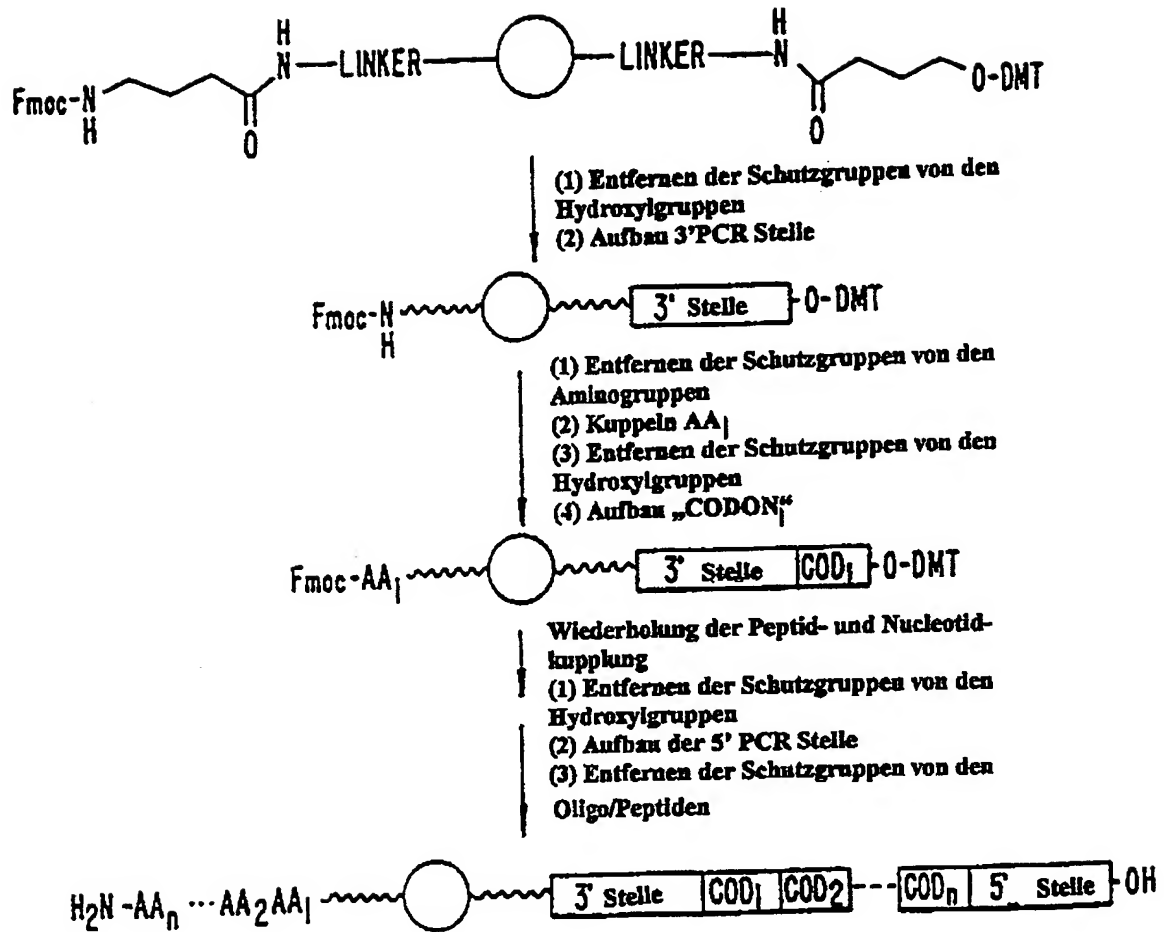


FIG. 8.

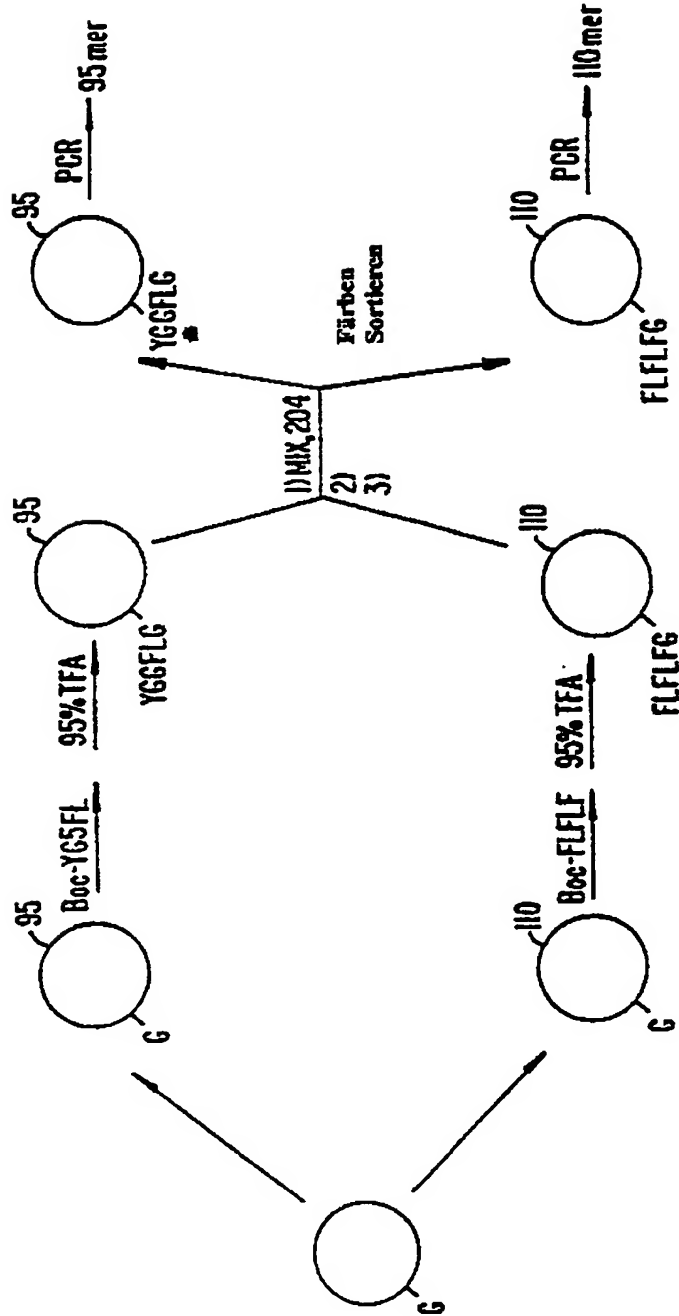
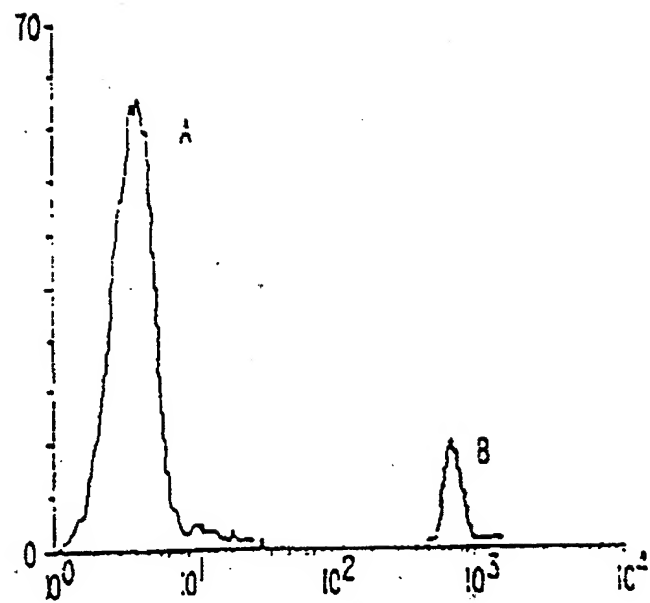


FIG. 9.

*FIG. 10.*

13/13

FIG. IIA.

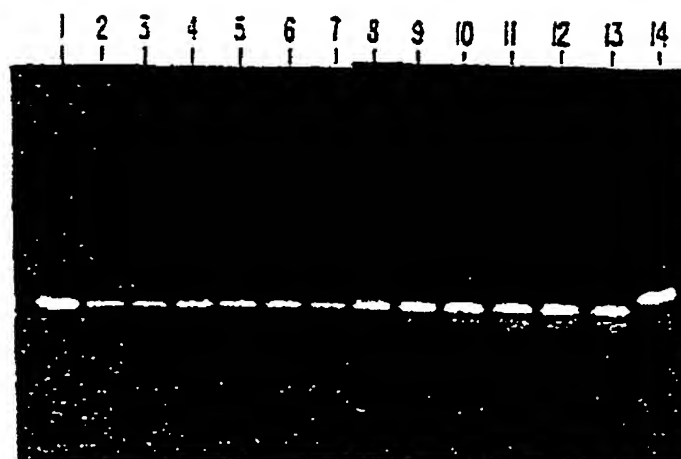


FIG. IIB.

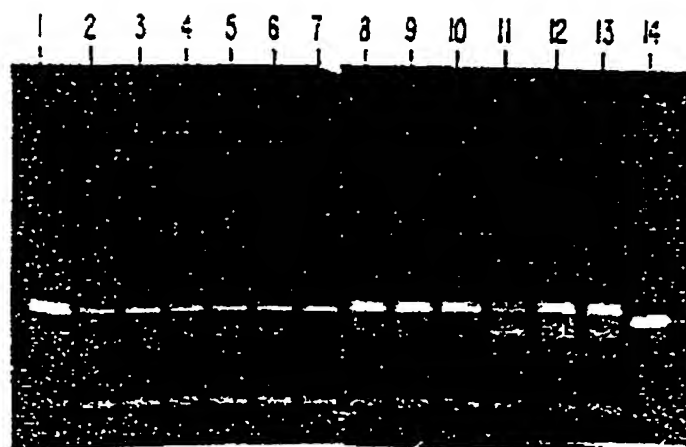
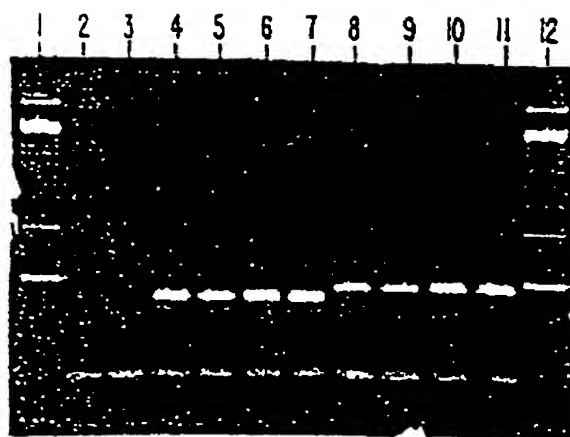


FIG. IIC.



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)